

Zur Kenntnis der höherwertigen Verbindungen bei den seltenen Erden

I. Über das Lanthanoxyd

Von

GUSTAV JANTSCH und ERNST WIESENBERGER

Aus dem Institut für anorganisch-chemische Technologie und analytische
Chemie an der Technischen Hochschule Graz

(Vorgelegt in der Sitzung am 14. Jänner 1932)

Auf dem Gebiete der seltenen Erden haben in der letzten Zeit besonders jene Untersuchungen ein erhöhtes Interesse beansprucht, die sich mit dem Auftreten anderer Wertigkeitsstufen als der normalen Dreiwertigkeit bei den einzelnen Gliedern der Lanthanidenreihe beschäftigen, weil denselben für die Systematik dieser Elementengruppe eine grundlegende Bedeutung zukommt. Während die Frage nach der Bildung von Verbindungen mit zweiwertigem Erdelement ziemlich geklärt erscheint und die Eigenschaften der betreffenden Salze eingehend studiert wurden, bedürfen unsere Kenntnisse über das Auftreten höherer Valenzahlen einer weiteren Vertiefung.

Neben den gut untersuchten Cer(IV)verbindungen kennt man bisher nur vom Praseodym und vom Terbium höhere Oxyde. Es ist aber nicht gelungen, Salze herzustellen, die sich von den letzteren herleiten, weil sich diese Oxyde bei der Einwirkung von Säuren unter Bildung von (III) Salzen zersetzen.

Den Sulfiden der allgemeinen Formel MeS_2 muß nach den Untersuchungen von W. KLEMM, K. MEISEL und H. A. von VOGEL¹ die Formulierung $\text{Me}_2\text{S}_3 \cdot \text{S}$ zugesprochen werden. Sie sind als Polysulfide aufzufassen.

Da wir uns hier nur mit den Oxyden beschäftigen wollen, fallen die Einwirkungsprodukte von Wasserstoffsuperoxyd oder anderen Peroxyden auf die Lösungen der seltenen Erdsalze bei Gegenwart von Alkalien aus dem Rahmen unserer Betrachtungen heraus. Dieselben enthalten keine höheren Wertigkeitsstufen; sie

¹ W. KLEMM, K. MEISEL und H. A. von VOGEL, Z. anorg. Chem. 190, 1930, S. 133.

sind vielmehr als Anlagerungsprodukte von Wasserstoffsuperoxyd an die Hydroxyde bzw. an die basischen Salze aufzufassen.

Mit den höheren, dunkel gefärbten Oxyden des Praseodyms hat man sich in den letzten Jahren mehrfach beschäftigt². Das Oxyd PrO_2 , das nur unter bestimmten Bedingungen in reiner Form erhalten werden kann, leitet sich, wie besonders aus den magnetischen Messungen³ und der Gleichheit des Gitteraufbaues⁴ von PrO_2 mit CeO_2 hervorgeht, vom vierwertigen Praseodym ab. Beim Glühen der Praseodymsalze flüchtiger Säuren an der Luft erhält man ein Oxyd, dessen Zusammensetzung weitgehend von den Erhitzungsbedingungen unabhängig ist und welchem annähernd die Formel Pr_6O_{11} zukommt. Dasselbe scheint eine salzartige Verbindung von Pr_2O_3 mit PrO_2 zu sein. Ähnliche Verhältnisse treffen wir bei dem wegen seiner schweren Zugänglichkeit noch wenig untersuchten Terbium. Neben Tb_2O_3 scheinen die Oxyde Tb_4O_7 bzw. Tb_6O_{11} und TbO_2 zu bestehen⁵.

Auch bei den anderen seltenen Erdelementen wurde nach dem Auftreten höherer Oxyde gefahndet. Die Ergebnisse der diesbezüglichen Untersuchungen sind teilweise recht widersprechend⁶; immerhin konnte aber aus denselben geschlossen werden, daß die Existenz derartiger Oxyde eine recht zweifelhafte ist.

Vor einiger Zeit haben jedoch J. M. KOLTHOFF und R. ELMQUIST⁷ bei ihren Untersuchungen über quantitative Bestimmungen

² W. PRANDTL und K. HUTTNER, Z. anorg. und allg. Chem. 149, 1925, S. 235; P. H. BRINTON und H. A. PAGEL, Journ. Amer. Chem. Soc. 45, 1923, S. 1460; H. A. PAGEL und P. H. BRINTON, Journ. Amer. Chem. Soc. 51, 1929, S. 42.

³ W. KLEMM, Z. ang. Chem. 44, 1931, S. 254.

⁴ V. GOLDSCHMIDT, Osloer Akad. Ber. 1926, Nr. 2, S. 38.

⁵ G. URBAIN, Ann. chim. phys. (8) 18, 1909, S. 277; V. GOLDSCHMIDT, Osloer Akad. Ber. 1926, Nr. 2, S. 38; C. JAMES und D. W. BISSEL, Journ. Amer. Chem. Soc. 36, 1914, S. 2065; A. J. GRANT und C. JAMES, Journ. Amer. Chem. Soc. 37, 1915, S. 2652.

⁶ R. HERMANN, J. prakt. Chem. 82, 1861, S. 385; H. ZSCHIESCHE, J. prakt. Chem. 107, 1869, S. 65; B. BRAUNER, Proc. Chem. Soc. 191, 1897/98, S. 71, und 17, 1901, S. 66, Z. anorg. Chem. 32, 1902, S. 1; A. WÄGNER, Z. anorg. Chem. 42, 1904, S. 118; R. MARC, Ber. D. ch. G. 35, 1902, S. 2370; P. T. CLEVE, Bull. soc. chim. (2) 39, 1883, S. 151; F. R. M. HITCHCOCK, Journ. Amer. Chem. Soc. 17, 1895, S. 525; L. A. SARVER und P. H. BRINTON, Journ. Amer. Chem. Soc. 49, 1927, S. 943; H. A. PAGEL und P. H. BRINTON, Journ. Amer. Chem. Soc. 51, 1929, S. 42; R. J. MEYER und KOSS, Ber. D. ch. G. 35, 1902, S. 3740; R. J. MEYER, Z. anorg. Chem. 41, 1904, S. 94.

⁷ J. M. KOLTHOFF und R. ELMQUIST, Journ. Amer. Chem. Soc. 53, 1931, S. 1230.

von Lanthan Beobachtungen gemacht, die mit den bisherigen Erfahrungen über das Verhalten des Lanthanoxyds nicht in Einklang zu bringen sind. Bei andauerndem Erhitzen von La_2O_3 im elektrisch geheizten Muffelofen bei Luftzutritt auf Weißglut beobachteten sie ein Ansteigen des Gewichtes des Oxyds. Die Zunahmen betrugen bei fünf verschiedenen Oxyden bis zu 10·8%. Bei anderen Versuchen, wo verschiedene Oxyde, hergestellt aus dem Hydroxyd, dem Oxalat bzw. dem Nitrat zur Anwendung kamen, waren die Gewichtserhöhungen 18·5 bis 19·7%. Dieselben entsprechen annähernd der Bildung von La_2O_5 bzw. La_2O_7 . Es gelang diesen Autoren jedoch nicht, jene Bedingungen, insbesondere die erforderlichen Temperaturen festzulegen, bei denen die Reproduzierbarkeit dieser Versuchsergebnisse stets gewährleistet war.

Bei anderen Versuchen, bei welchen die Temperaturen gemessen wurden, konnten dieselben eine Gewichtszunahme des La_2O_3 von 5·65% feststellen. Diese Zunahme sank bei weiterem Erhitzen auf 2% herab. Als das Oxyd längere Zeit im Verbrennungsofen im Sauerstoff- bzw. Luftstrom bei Temperaturen zwischen 800 und 1200° erhitzt wurde, ließ sich nur eine geringe Zunahme seines Gewichtes beobachten. Dasselbe war der Fall, als demselben in Anlehnung an die Versuche von R. MARC⁸ geringe Mengen Ceroxyd bzw. Platin beigemischt wurden. Trotz dieser zum Teil recht widersprechenden Beobachtungen glauben J. M. KOLTHOFF und R. ELMQUIST, die Bildung der Oxyde La_2O_5 bzw. La_2O_7 beim lang dauernden Erhitzen von La_2O_3 auf Weißglut im elektrischen Ofen festgestellt zu haben.

In dem von W. KLEMM⁹ aufgestellten „periodischen System der dreiwertigen Ionen der seltenen Erdelemente“ kommt das Auftreten von Verbindungen mit niederen Valenzzahlen beim Samarium, Europium und Ytterbium richtig zum Ausdruck. Die Existenz und das Verhalten höherer Wertigkeitsstufen bei einzelnen Gliedern der Reihe sind jedoch nicht in der gleichen Weise berücksichtigt. Den Verbindungen des vierwertigen Cers können keine analogen des vierwertigen Terbiums an die Seite gestellt werden, weil die höheren Terbiumoxyde sich wie jene des Praseodyms verhalten und von ihnen keine Salze darstellbar sind. Das Dysprosiumoxyd verhält sich analog wie das Gadolinium- bzw.

⁸ R. MARC, l. c.

⁹ W. KLEMM, Z. anorg. Chem. 184, 1929, S. 345; 187, 1930, S. 29.

das Holmiumoxyd. Es nimmt nicht wie das Pr_2O_3 beim Glühen an der Luft Sauerstoff unter Bildung eines höheren Oxyds auf. Lanthanoxyd, Gadoliniumoxyd und Cassiopeiumoxyd müssen sich nach W. KLEMM gleichartig verhalten. Denselben kommt die allgemeine Formel Me_2O_3 zu. Wenn nun die von J. M. KOLTHOFF und R. ELMQUIST angegebenen höheren Lanthanoxyde tatsächlich existieren, so würde das neue Schwierigkeiten für eine Systematik der seltenen Erden bedeuten, denn es müßte dann erwartet werden, daß auch das Gadolinium und das Cassiopeium derartige höhere Oxyde zu bilden vermögen. Die bisherigen Erfahrungen geben dafür aber keine Anhaltspunkte.

Um eine Klärung dieser unübersichtlichen Lage herbeizuführen, haben wir eine Untersuchungsreihe über die höherwertigen Verbindungen der seltenen Erdelemente begonnen und berichten nun über die Ergebnisse unserer Versuche mit Lanthanoxyd. Wir haben uns bei denselben bemüht, die von J. M. KOLTHOFF und R. ELMQUIST gewählten Versuchsbedingungen möglichst zu berücksichtigen. Es ist uns jedoch nicht gelungen, beim lang andauernden Erhitzen des Oxyds auf hohe Temperaturen jene Gewichtszunahmen desselben festzustellen, von welchen die Autoren berichten. Auch konnten wir keine Beobachtungen machen, welche für die Bildung der Oxyde La_2O_5 und La_2O_7 sprechen würden.

Als Versuchsmaterial verwendeten wir zunächst ein von der Deutschen Gasglühlicht-Auer-Gesellschaft in Berlin uns freundlichst zur Verfügung gestelltes Lanthanammonnitrat. Das Absorptionsspektrum der in 10 cm Schichtdicke beobachteten 20%igen Lösung zeigte keinerlei Absorptionsbanden. Das Oxyd, welches wir sowohl durch Ammoniakfällung über das Hydroxyd als auch über das Oxalat durch Glühen bei 800° herstellten, wies einen geringen gelblichen Stich auf. Wir bezeichnen dieses Oxyd im folgenden als La_2O_3 I. Die Nitratlösung gab mit Ammoniak und Wasserstoffsuperoxyd eine vollkommen weiße Fällung.

Das Salz war somit cerfrei, enthielt aber geringe Mengen von Praseodym. Da R. MARC¹⁰ die Bildung höherer Oxyde auf einen Gehalt des Lanthanoxyds an fremden Erden zurückführt, haben wir unser Material in Form der Ammondoppelnitrate einer Fraktionierung in neutraler Lösung unterworfen, um die letzten Spuren des Praseodyms zu entfernen. Das aus der Kopffraktion

¹⁰ R. MARC, l. c.

der 53. Reihe gewonnene La_2O_3 zeigte bei andauerndem Glühen keine Verfärbung mehr, was nach unseren Erfahrungen als bestes Zeichen seiner Reinheit anzusehen ist, weil die geringsten Spuren des dem Lanthan hartnäckig anhaftenden Praseodyms das La_2O_3 bereits verfärben. Wir bezeichnen das so gereinigte Oxyd im folgenden mit La_2O_3 II.

Die Versuche zur Feststellung der Bildung höherer Oxyde des Lanthans haben wir wie folgt ausgeführt:

In der ersten Versuchsreihe erhitzen wir das zum konstanten Gewichte geglühte Oxyd im Heraeus'schen, elektrisch geheizten Tiegelofen unter Einleiten eines langsamen Stromes gereinigter und trockener Luft lange Zeiten auf 1100 bzw. 1200° und bestimmten die Gewichtsveränderung. Die Glühtemperaturen maßen wir mittels eines Thermoelementes aus Platin — Platin-Rhodium. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt:

Versuch Nr.	Oxyd Nr.	Glüh-temperatur	Versuchs-zeit in Stunden	angewandt g La_2O_3	Gewichts-veränderung des La_2O_3 in g	Gewichts-veränderung des La_2O_3 in %
1	La_2O_3 I	1200°	22	1·0170	+ 0·0023	+ 0·22
2	La_2O_3 I	1200°	12	1·2899	+ 0·0017	+ 0·13
3	La_2O_3 II	1200°	9½	0·3876	0·0000	0·00
4	La_2O_3 II	1200°	12	0·5082	+ 0·0008	+ 0·15
5	La_2O_3 II	1100°	10	0·5409	+ 0·0002	+ 0·04
6	La_2O_3 II	1100°	10	0·4865	+ 0·0003	+ 0·06

Nach dem Glühen zeigten alle Oxyde, auch jene, welche von dem gereinigten Lanthanmaterial stammten, eine gelbliche Färbung. Dieselbe ist, wie wir auf mikroanalytischem Wege feststellen konnten, durch die Gegenwart geringer Mengen von zerstäubtem Platin des Tiegels bedingt. Nach der Entfernung dieses Platins zeigten die aus La_2O_3 II gewonnenen Oxyde wieder reinweiße Farbe. Diese Versuchsreihe läßt keine Gewichtsveränderungen erkennen, welche für das Auftreten höherer Oxyde sprechen würden.

Bei den Versuchen der nächsten Reihe erhitzen wir die Oxyde im Sauerstoff- bzw. im Luftstrome, der sowohl trocken als auch feucht zur Anwendung kam. Als Gefäßmaterial verwandten wir Platin als auch Porzellan und eine aluminiumoxydreiche

Masse der Meißner Manufaktur, nachdem wir uns überzeugt hatten, daß die letzteren mit den Oxyden bei den in Betracht kommenden Temperaturen nicht reagieren. Die Schiffchen befanden sich in einem unglasierten Rohre aus Berliner K-Masse, das in einem Ofen mit Silitstäben erhitzt wurde. Zur Temperaturmessung wurde die Lötstelle eines Thermoelementes aus Platin — Platin-Rhodium im Rohre über die Mitte des Schiffchens gebracht. Die Reinigung der zugeführten Gase war die übliche. Um ein Ankleben der Platinschiffchen an die Wandungen des Porzellanrohres zu verhindern, stellten wir dasselbe in ein Schutzschiffchen aus Zirkonmasse.

Über die Versuchsergebnisse orientiert die folgende Tabelle:

Versuch Nr.	Oxyd Nr.	Schiffchen- material	Angewandtes Gas	Tem- peratur	Versuchszeit in Stunden	Angewandt La_2O_3 in g	Gewichts- veränderung La_2O_3 in g	Gewichts- veränderung des La_2O_3 in %
7	La_2O_3 I	Platin	Sauerstoff trocken	1000°	10	0·5682	+ 0·0013	+ 0·23
8	La_2O_3 I	Platin	Sauerstoff trocken	1100°	10	0·4700	+ 0·0003	+ 0·06
9	La_2O_3 I	Porzellan	Sauerstoff trocken	1000°	10	0·4693	+ 0·0002	+ 0·04
10	La_2O_3 I	Porzellan	Sauerstoff trocken	1000°	12	0·4431	+ 0·0001	+ 0·02
11	La_2O_3 I	Platin	Sauerstoff trocken	1200°	10	0·3695	— 0·0015	— 0·4
12	La_2O_3 I	Platin	Sauerstoff trocken	1300°	18	0·5144	— 0·0035	— 0·7
13	La_2O_3 II	Platin	Luft trocken	1300°	9½	0·4334	— 0·0002	— 0·05
14	La_2O_3 II	Platin	Luft trocken	1300°	9½	0·3225	— 0·0001	— 0·03
15	La_2O_3 II	Platin	Luft trocken	1200°	9½	0·3802	— 0·0002	0·05
16	La_2O_3 II	Platin	Luft trocken	1200°	9½	0·3004	— 0·0001	— 0·03
17	La_2O_3 II	Platin	Luft trocken	1100°	9½	0·3335	0·0000	0·00
18	La_2O_3 II	Platin	Luft trocken	1300°	20	0·3277	— 0·0012	— 0·4
19	La_2O_3 II	Platin	Luft feucht	1300°	21	0·3430	— 0·0018	— 0·5
20	La_2O_3 II	Platin	Sauerstoff trocken	1100°	22	0·3713	+ 0·0004	+ 0·1
21	La_2O_3 II	Aluminium- oxydmasse	Sauerstoff trocken	1100°	22	0·3629	0·0000	0·00

Die Oxyde waren auch bei dieser Versuchsreihe nach dem Glühen, sofern Platin als Gefäßmaterial Anwendung fand, gelblich bis gelbbraun gefärbt. In allen anderen Fällen blieben die Oxyde weiß. Die Verfärbung muß wieder auf zerstäubtes Platin

zurückgeführt werden. Bei einigen Versuchen haben wir die Menge dieses Platins ermittelt und festgestellt, daß dieselbe mit der Gewichtsabnahme übereinstimmte, welche die Platinschiffchen nach dem Herauslösen des Lanthanoxyds aufwiesen. Daraus geht hervor, daß ein Mitführen zerstäubten Platins durch den Gasstrom nicht eingetreten war und daß die Gewichtsveränderungen, welche nach dem andauernden Erhitzen festgestellt wurden, nur das Lanthanoxyd betreffen. Die Veränderungen der Schiffchengewichte wurden überdies bei jedem Versuche festgestellt; dieselben erreichten niemals eine Größe, die für die Auswertung der Versuchsergebnisse von Einfluß sein könnte.

Schließlich haben wir mit dem Oxyd La_2O_3 II Versuche wiederholt, welche R. ELMQUIST¹¹ in ihrer Dissertation angibt. Dieselben bestehen darin, daß man das Oxyd im elektrisch geheizten Ofen im Platintiegel andauernd glüht und seine Gewichtsveränderung bei verschiedener Glühdauer ermittelt. Nach 36 Stunden Glühdauer wird dann das Oxyd in Salpetersäure gelöst, die Lösung eingedampft und der Rückstand verglüht. Dieses so erhaltene Oxyd wird nun wieder bei Rot- bzw. Weißglut durch 27 Stunden erhitzt und die Gewichtsveränderung bestimmt. Während R. ELMQUIST hierbei Gewichtsveränderungen des La_2O_3 bis zu 7.4 bzw. 12.03% beobachtet hat, betrugen bei unseren Versuchen die maximalen Erhöhungen 0.5%, die wir überdies nur auf hinzugetretene Fehler glauben zurückführen zu sollen.

Unsere Versuche haben somit keinen Anhaltspunkt dafür erbracht, daß man durch andauerndes Erhitzen des Lanthanoxyds auf höhere Temperaturen zu höheren Oxyden dieses Elementes gelangen kann.

¹¹ R. ELMQUIST, Dissertation, University of Minnesota, 1930, S. 77.

Die Konstitution des Farbstoffes der Leinkrautblüten (*Linaria vulgaris*)

Von

LEOPOLD SCHMID und WALTHER RUMPEL

Aus dem II. Chemischen Universitäts-Laboratorium in Wien

(Vorgelegt in der Sitzung am 14. Jänner 1932)

In der ersten Mitteilung¹ über den Linariafarbstoff gelang es, dessen *Glukosidnatur* festzustellen.

Es stehen mit einem Molekül der Farbstoffkomponente je ein Molekül *Hexose* und ein Molekül *Methylpentose* in Bindung.

Für die Farbstoffkomponente wurde eine Bruttoformel von $C_{17}H_{14}O_6$ angenommen, in der zwei freie Hydroxyle und zwei methylierte Hydroxyle enthalten sind.

Die Behauptung, wir hätten es mit einem Dioxy-Dimethoxyflavon zu tun, konnte damals aber deshalb nicht mit Sicherheit ausgesprochen werden, weil nach dem alkalischen Abbau immer neben den zu erwartenden Reaktionsprodukten ein *Kohlenwasserstoff* zu isolieren war, dessen Auftreten aber nach der Formel $C_{17}H_{14}O_6$ nicht zu erwarten war.

Nachdem nun neuerlich Linariablüten aufgearbeitet wurden, galt es in erster Linie, das Auftreten des Kohlenwasserstoffes zu klären.

Zum alkalischen Abbau wurde ursprünglich ein Ausgangsmaterial benutzt, das *nicht* durch Sublimation, sondern durch Umfällen aus alkoholischer Lösung mit Wasser, aber natürlich auch bis zur Schmelzpunktkonstanz 201° gereinigt worden war.

Anders war die Sache, als zur Kalischmelze ein Material verwendet wurde, welches noch außerdem mit Petroläther gewaschen war. In diesem letzteren Fall war auch nach der Kalischmelze kein Kohlenwasserstoff mehr zu beobachten. Es ist damit festgestellt, daß der Kohlenwasserstoff kein konstitutioneller Bestandteil des Leinkrautfarbstoffes ist, sondern nur einen Begleiter dieses darstellt. Es ist somit an dem Abschnitt „Aufarbeitung und Darstellung des Farbstoffes“ in unserer ersten Mitteilung ergänzend zu bemerken, daß der Farbstoff, wenn er nicht durch Hochvakuumsublimation gereinigt wurde, unbedingt

¹ Monatsh. Chem. 57, 1931, S. 421, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 1087.

zu seiner Reindarstellung mit Petroläther ausgekocht werden muß.

Eigentümlich ist nur, daß der Schmelzpunkt des Farbstoffes auch vom Kohlenwasserstoffgehalt bis zu 0.3% nicht beeinflusst ist. Gerade diese Schmelzpunktsübereinstimmung ist der Grund gewesen, den Körper vom Schmelzpunkt 201° auch ohne Petrolätherbehandlung zum Abbau zu benutzen, weshalb eben dann der Kohlenwasserstoff unter den Spaltprodukten gefunden wurde.

Das Vorkommen von Kohlenwasserstoffen im Extrakt der Linariapflanze erwähnen schon KLOBB und FANDRE, in der Abhandlung „Beitrag zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des Leinkrauts“². Das Neue an unserer Beobachtung ist die Identifizierung des aus den Blüten extrahierten Kohlenwasserstoffes mit *Hentriakontan*. Dieser Kohlenwasserstoff war einheitlich, hatte den Schmelzpunkt 67—69°, zeigte Indifferenz gegen Brom. Die Analyse ergab 84.88% C, 14.38% H, was mit der Theorie für die Formel $C_{31}H_{64}$ in gutem Einklang stand. Die Molekulargewichtsbestimmung nach RAST ergab 443, was mit der Theorie 436 gut übereinstimmt. Ein Mischschmelzpunkt, mit dem von R. KUHN³ aus *Tagetes* hergestellten *Hentriakontan* ergab keine Depression. Herrn Prof. KUHN (Heidelberg) möchten wir für die lebenswürdige Ausführung des mit seinem Präparat vorgenommenen Mischschmelzpunktes an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

Nun wurde der *alkalische Abbau* des Aglukons an völlig kohlenwasserstofffreiem Produkt auf zweifache Art wiederholt:

Das eine Mal mit 72%iger Kalilauge, das andere Mal mit 35%iger Kalilauge unter Kochen am Rückflußkühler.

In gleicher Weise war bei beiden Abbauprobungen *wieder Anissäure* nachzuweisen.

Da für diese Reaktionen nur mehr sorgfältig mit Petroläther gewaschenes und im Hochvakuum sublimiertes Ausgangsmaterial in Verwendung kam, so konnte auch der Kohlenwasserstoff nicht mehr nachgewiesen werden.

In den phenolischen Anteilen fand sich ein aromatisch riechendes Öl, allerdings nur in recht geringer Menge. Es ging im Hochvakuum zwischen 100 und 140° über. Infolge der geringen Substanzmenge konnte nur ein Methoxylgehalt von 16.37% und

² Chem. Centr. 1907, XI/I, S. 574; Bull. soc. chim. Paris (3) 35, S. 1210—1220, 5/12.

³ Z. physiol. Chem. 197, S. 141.

16.56% nachgewiesen, jedoch sonst keine weiteren Aussagen über seine Konstitution gemacht werden.

Der Mangel, das Phenol an dieser Stelle nicht identifiziert zu haben, war für die endgültige Lösung der Konstitution nicht hinderlich.

Aus den Azetylierungsversuchen, den Methoxylbestimmungen und den neuerlichen alkalischen Abbauversuchen war eine Formulierung im Sinne von $C_{15}H_6O_2(OH)_2(OCH_3)_2$ sichergestellt.

Die nächste Frage war nun, von welchem methylfreien Stammkörper sich unser Naturprodukt, der *Dimethyläther*, ableitet. Als solcher kam einer von der Formel $C_{15}H_{10}O_6$ in Frage. Von diesen Isomeren sind bereits bekannt das Lotoflavin, Luteolin, Skutellarein, Fisetin, Kämpferol.

Zur Durchführung des Vergleiches mit diesen mußten wir nun den Dimethyläther in das methoxylfreie Produkt verwandeln. Dies geschah durch Kochen mit Jodwasserstoffsäure (Dichte 1.7). Die Auswertung der Jodwasserstoffsäure-Behandlung hatte sich bisher in unserer Arbeit lediglich auf die quantitative Ermittlung der Methoxylgruppen nach der Mikromethoxylbestimmung erstreckt. In diesem Zusammenhang müssen wir auf die Beobachtung hinweisen, daß die beim Aglukon gefundenen Methoxylwerte gegenüber den theoretisch zu erwartenden über 1% zu niedrig ausfielen, trotzdem die Zersetzungsdauer beträchtlich ausgedehnt wurde. Die gleiche Beobachtung machten wir später auch beim *Dimethyl-Diazetyl-Derivat* und beim *Trimethyl-Derivat* unseres Ausgangsmaterials. Eine gleiche Beobachtung ist von WESSELY und MOSER⁴ in der Literatur bekannt.

Die Abspaltung der Methoxylgruppen in größerem Maßstab wurde nun durch 2½ständiges Kochen mit Jodwasserstoffsäure am Rückfluß durchgeführt. Nach dem Eingießen des Reaktionsproduktes in Wasser wurde freies Jod mittels Schwefeldioxyds reduziert. Nach dem Filtrieren hinterblieb ein schön gelbgefärbtes Produkt. Nach dem Auflösen in Alkohol und Ausfällen mit Wasser wurde dieses zwischen 185 und 190° im Hochvakuum sublimiert. Das Sublimat war tatsächlich methoxylfrei, was durch eine qualitative Mikromethoxylbestimmung, die negativ ausfiel, bestätigt werden konnte. Ein Schmelzpunkt ist nicht anzugeben, sondern man kann nur von einem Zersetzungspunkt sprechen, der nach schnellem Erhitzen bei 340° gefunden wurde. Die Analyse

⁴ Monatsh. Chem. 56, 1930, S. 97, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (IIb) 139, 1930, S. 367.

dieses Körpers ergab 63.13% C, 3.48% H, was auf die Theorie einer Verbindung von der Formel $C_{15}H_{10}O_6$ recht gut stimmt. Dieser Befund steht mit der obigen, für das Ausgangsmaterial abgeleiteten Formel $C_{17}H_{14}O_6$ in Übereinstimmung. Der Ausgangskörper ist somit ein Dimethyläther des Produktes $C_{15}H_{10}O_6$.

Das entmethylierte Produkt gab folgende Reaktionen: Bleiazetatlösung erzeugt in alkoholischer Lösung einen roten, Zinnchlorür einen gelben Niederschlag. Mit Eisenchlorid gibt die Lösung eine rotbraune, mit Barytwasser eine spinatgrüne, mit Kalilauge eine rötliche Färbung. Konzentrierte Schwefelsäure erzeugt Gelbfärbung mit schwach grünlicher Fluoreszenz.

An der Hand des bisher vorliegenden Versuchsmaterials hatten wir schon durch Vergleich mit Literaturangaben⁵ Anhaltspunkte dafür, daß dem Blütenfarbstoff des Leinkrautes der *Skutellareinring* zugrunde liegen dürfte.

Ein weiterer Beweis dafür wurde durch den alkalischen Abbau des methoxylfreien Produktes erbracht. Diese Zersetzung wurde mit 35%iger wässriger Kalilauge durch Kochen unter Rückfluß vorgenommen. In guter Ausbeute wurde dabei *p-Oxybenzoesäure* vom Schmelzpunkt 209—210° und *p-Oxyazetophenon* vom Schmelzpunkt 108° erhalten. Beide Produkte wurden durch Mischschmelzpunkt mit den entsprechenden synthetischen Präparaten sowie durch Analysen identifiziert.

Ferner wurde am entmethylierten Produkt die Funktion der Sauerstoffatome durch Darstellung eines Azetylderivates geprüft. Die Analysenwerte dieses Azetylproduktes ließen auf einen Tetraazetylkörper des Skutellareins $C_{23}H_{18}O_{10}$ schließen (F. P. 235—237°).

Im folgenden wurde das entmethylierte Ausgangsmaterial der Reihe nach mit Diazomethan, mit Dimethylsulfat und Jodmethyl methyliert. Mit der besten Ausbeute verlief die Methylierung mit Diazomethan, weniger gut mit Dimethylsulfat, am schlechtesten mit Jodmethyl. Bei den zwei ersten Verfahren resultierte der gleiche Dimethyläther vom Schmelzpunkt 189°, der mit dem entsprechenden, aus Skutellarein dargestellten Trimethyläther identisch war. Das Reaktionsprodukt, das keine Spur eines Tetramethyläthers enthielt, läßt den Schluß zu, daß die nicht-methylierbare Hydroxylgruppe der Carbonylgruppe des Flavon-

⁵ GOLDSCHMIEDT und ZERNER, Monatsh. Chem. 31, 1910, S. 439, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (IIb) 119, 1910, S. 439; WESSELY u. MOSER, Monatsh. Chem. 56, 1930, S. 97, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (IIb) 139, 1930, S. 367.

ringes benachbart sein muß. Dieses Verhalten stimmt ja auch mit den Beobachtungen am Skutellarein überein.

Hingegen ließ sich diese nicht methylierte Hydroxylgruppe nachweisen durch eine Azetylierung, nach der ein Trimethyl-Monoazetylkörper ($C_{20}H_{18}O_7$) in quantitativer Ausbeute zu isolieren war, der ebenfalls gleichen Schmelzpunkt zeigte wie das entsprechende Trimethyl-Monoazetyl-Skutellarein (F. P. 169°).

Bemerkenswert erscheint uns der Hinweis darauf, daß bei der Methylierung der Farbstoffkomponente und nach der Methylierung des mit Jodwasserstoffsäure entmethylierten Farbstoffes das gleiche Trimethylprodukt ($C_{18}H_{16}O_6$) vom Schmelzpunkt 189° zu erhalten war. Die Mischschmelzpunkte dieser Produkte ergaben keine Depression.

Daraus darf wohl abgeleitet werden, daß während der Entmethylierung des Ausgangsmaterials keine Wanderung der Hydroxylgruppen des Flavonringes vor sich gegangen ist.

Am Trimethyläther sowie an dessen Azetylderivat ($C_{20}H_{18}O_7$) mußten wir wieder die Beobachtung machen, daß bei der Methoxylbestimmung die Werte konstant zu tief ausfielen.

Anschließend nun eine Tabelle der Schmelzpunkte der korrespondierenden Derivate des Leinkrautfarbstoffes und des Skutellareins.

Name	Leinkraut Farbstoff	Skutellarein	Misch- Schmelzp.	Bemerkung
Trimethylprodukt	188—189°	189°	188—189°	—
Tetraazetylprodukt	237°	237—239°	238°	—
Dimethyldiazetylprodukt	146—149°	148—149°	148—149°	b. rasch. Erhitz.
Trimethylmonoazetylpr.	169°	168—169°	168°	b. rasch. Erhitz.

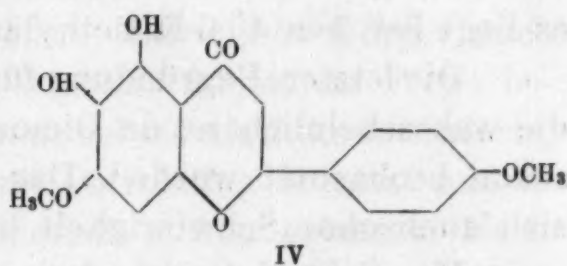
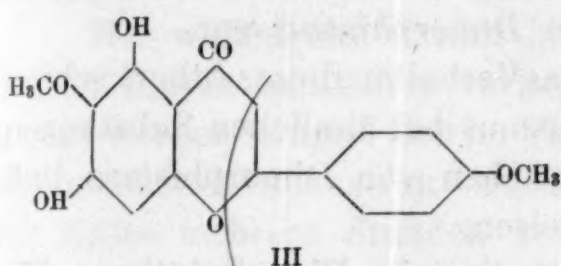
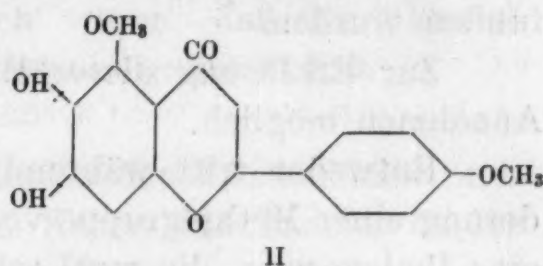
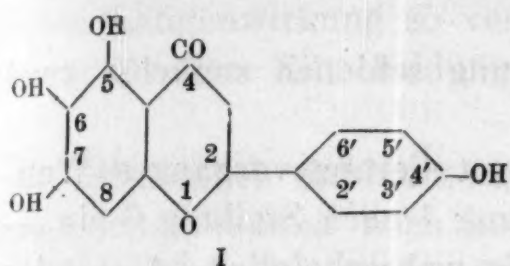
Es ist uns eine angenehme Pflicht, Herrn Privatdozenten Dr. FRITZ WESSELY (Wien) für die entgegenkommende Überlassung von Skutellareinderivaten für diese Mischschmelzpunktsbestimmungen unseren besonderen Dank auszusprechen.

Nach diesen experimentellen Befunden war nun sicher gestellt, daß wir es beim Leinkrautfarbstoff mit einem Skutellareinderivat zu tun haben.

Die nächste Aufgabe bestand in der Ortsbestimmung der zwei Hydroxylgruppen, welche durch Methyl veräthert sind; denn unser Ausgangsmaterial war ja zweifellos als eines der möglichen Dimethylskutellareine anzusprechen.

Dimethyläther des Skutellareins sind mehrere möglich. Für unsere Überlegungen kommen aber nur diejenigen in Frage,

welche die eine Äthergruppe in Stellung 4' aufweisen. Für diese in 4'-Stellung verätherten Dimethyl-Skutellareine kommen folgende drei Isomere in Betracht, wenn man für Skutellarein die mehrfach auch durch Synthese bewiesene Formel I zugrunde legt⁶.



Von den für unseren Dimethyläther in Betracht kommenden möglichen drei Formeln scheidet II aus. Denn weder mit Diazomethan noch mit Dimethylsulfat war es möglich, ein Tetramethylskutellarein darzustellen. Dieses Produkt hätte sich aber ohne Schwierigkeiten bilden müssen, da in Stellung 6 und 7 normalerweise Umsetzungen glatt verlaufen.

Hingegen bildete sich quantitativ aus unserem Ausgangsmaterial ein Trimethyläther. Dieser Befund zeigt an, daß die schwer methylierbare Hydroxylgruppe frei ist und der Carbonylgruppe benachbart sein muß. Formel III ist auch schon bewiesen durch eine Synthese von WESSELY und MOSER. Dieser Dimethyläther zeigt den Schmelzpunkt 218° und ist somit mit unserem Dimethyläther vom Schmelzpunkt 201° nicht identisch. Somit blieb nur mehr Formel IV übrig, mit welcher unser Ausgangsmaterial identisch sein sollte.

Soweit schien die Schlußfolgerung richtig, wenn nicht eine Beobachtung dagegen gesprochen hätte. Denn das Diazetylderivat der Verbindung III war mit dem Diazetylderivat unseres Dimethyläthers im Schmelzpunkte 149° gleich und, was besonders bemerkenswert ist, es zeigte auch im Mischschmelzpunkt keine Depression.

⁶ BARGELLINI, Gazz. chim. 45, 1915 (I), S. 69; 49, 1919 (II), S. 47; ROBINSON und SCHWARZENBACH, Journ. Chem. Soc. London 1930, S. 822; WESSELY und MOSER, Monatsh. Chem. 56, 1930, S. 97, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 367.

Jener Mischschmelzpunkt, der für die Identität des Diazetylproduktes mit jenem von der Formel III abgeleiteten sprach, war um so überraschender, als die Schmelzpunkte von Verbindung III und unserem Ausgangsmaterial bei 218 bzw. 201° gefunden wurden.

Zur Erklärung dieser Erscheinung schienen zunächst zwei Annahmen möglich.

Entweder tritt während des Azetylierungsvorganges Wanderung einer Methylgruppe von Stellung 7 nach Stellung 6 ein — eine Umlagerung, die wohl sehr wenig wahrscheinlich ist — oder es liegt bei dem 4', 6-Dimethyläther *Dimorphismus* vor.

Die letztere Begründung für das Verhalten dieses Äthers schien die wahrscheinlichere, da Dimorphismus bei ähnlichen Substanzen schon beobachtet wurde⁷. Das Bestehen von Dimorphismus ließ sich auch ohne Schwierigkeit beweisen.

Der Schmelzpunkt des synthetischen Dimethyläthers lag nach der Rückgewinnung aus seinem Azetylprodukt bei 201° und gab mit dem Äther aus *Linaria* keine Depression.

Seine Umwandlung gelingt auch durch wiederholtes Schmelzen; schon nach dem ersten Wiederholen des Schmelzpunktes sinkt dieser von 218° an allmählich, um dann nach mehrfacher Wiederholung schließlich bei 201° konstant zu bleiben. Umgekehrt gelingt es, durch Umkristallisation aus Alkohol den Äther vom Schmelzpunkt 201° in den vom Schmelzpunkt 218° überzuführen.

Nach diesen letzten Befunden kann man also für die methylierten Hydroxylgruppen die Stellung 6 und 4' als bewiesen ansehen, da jener Dimethyläther bereits durch Synthese bekannt ist.

Das Aglukon von *Linaria* hat somit die Formel III.

In die *Konstitution des Glukosids*, speziell bezüglich des Einbaues der Zuckerreste, sollte ein Methylierungsversuch mit Diazomethan einen Einblick gewähren.

Es zeigte sich, daß das Glukosid mit Diazomethan nicht methylierbar ist, was dadurch gewährleistet wurde, daß der Schmelzpunkt nach erfolgter Methylierung wieder unverändert bei 240° lag.

Die Hydrolyse führte auch zu unverändertem Aglukon vom Schmelzpunkt 201°, der nach wiederholtem Umkristallisieren aus Alkohol auf 218° anstieg.

Ob nun die zwei freien Hydroxylgruppen im Farbstoffgluko-

⁷ Journ. Chem. Soc. London 1929, S. 653.

sind tatsächlich durch je einen Zuckerrest veräthert sind, oder ob die schwerer methylierbare Hydroxylgruppe frei ist, kann man deswegen nicht entscheiden, weil mit Dimethylsulfat in alkalischer Lösung vorgenommene Methylierungsversuche infolge der schädlichen Laugenwirkung so verlustreich waren, daß der Materialvorrat für diese Entscheidung nicht mehr ausgereicht hat.

Schließlich möchten wir auf den in den Linariablüten vorkommenden *Mannit* noch hinweisen. KLOBB und FANDRE fanden bei Extraktion der *ganzen* Pflanze Mannit.

Wir wollen nun darauf hinweisen, daß dieser Körper auch in den Blüten lokalisiert vorliegt, was auf folgendem Wege bestätigt werden konnte. Der im Vakuum bei 60° stark konzentrierte, alkoholische Blütenextrakt wurde mit Petroläther versetzt und in der Kälte mehrere Stunden verschlossen stehen gelassen. Nach einiger Zeit hatten sich Kristalle ausgeschieden, die nach dem Umkristallisieren aus Alkohol schließlich den für Mannit charakteristischen Schmelzpunkt 169° aufwiesen.

Durch Darstellung der Benzalverbindungen des Mannits und Mischschmelzpunktbestimmungen zwischen den Benzalprodukten wurde die Identität beider Körper bewiesen.

Zum Abschluß möchten wir noch auf folgende Umstände hinweisen. Das Leinkraut gehört in die Klasse der *Rachenblütler*. Zu diesen zählt auch das Löwenmaul (*Antirrhinum majus*), dessen Blütenpigment Apigenin⁸ vorstellt und die Königskerze (*flores verbasci*)⁹, deren Farbstoff α -Crocetin ist.

Die Ansicht GEORG KLEINS¹⁰, daß die Natur des Blütenfarbstoffes innerhalb ein und derselben Klasse wechselt, findet in diesen Beispielen eine zwanglose Bestätigung.

Skutellarein wurde bisher nur, mit Glukuronsäure gepaart, unter dem Namen „Skutellarin“ aufgefunden in *Lippenblütlern*, wie *Scutellaria altissima*, *Galeopsis Tetrahit*, *Teucrium Chamaedris* u. a.¹¹.

⁸ Biochem. Ztschr. (7) 87, S. 141.

⁹ SCHMID und KOTTER, im Druck.

¹⁰ Monatsh. Chem. 41, 1920, Heft 7 und 8, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. 129, 1920.

¹¹ GOLDSCHMIEDT und ZERNER, Monatsh. Chem. 31, 1910, S. 439, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 119, 1910, S. 439; MOLISCH und GOLDSCHMIEDT, Monatsh. Chem. 23, 1902, S. 679, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 111, 1902, S. 679.

Speziell STRECKER hat in seiner Arbeit „Das Vorkommen des Skutellarins bei Labiaten und seinen Beziehungen zum Lichte“¹² mehrfach auf das Vorkommen von Skutellarin in Lippenblütlern und anderen Pflanzentypen hingewiesen. Er bediente sich hiebei der für dieses Produkt charakteristischen Barytwasserreaktion als Nachweis.

GOLDSCHMIEDT und ZERNER sind der Meinung, daß die Farbstoffkomponente Skutellarein in jenen Pflanzen, welche die Barytwasserreaktion gaben, nicht unbedingt immer an Glukuronsäure gebunden vorkommen müsse, sondern auch mit Zucker glukosidisch verknüpft und eventuell auch mit verätherten Hydroxylgruppen vorkommen kann.

Die Richtigkeit dieser Meinung hat sich auch in der Aufklärung der Konstitution des Leinkrautfarbstoffes gezeigt.

Zusammenfassend läßt sich nun sagen, daß der in der ersten Mitteilung erwähnte Kohlenwasserstoff neben dem Farbstoff in der Linariablüte vorkommt. Er ist identisch mit Hentriakontan, wie durch Mischschmelzpunkte bewiesen werden konnte.

Der Farbstoff ist eine Verbindung von der Formel $C_{17}H_{14}O_3$ (6, 4'-Dimethoxy-Skutellarein) und mit einem Mol. Hexose und einem Mol. Methylpentose glukosidisch verknüpft.

Experimenteller Teil.

I. Azetylierung von sublimiertem Aglukon.

0.5 g im Hochvakuum sublimiertes Aglukon wurden eine Stunde lang mit 5 g Essigsäureanhydrid unter Zusatz von 0.5 g Natriumazetat gekocht. Die ölige Reaktionsmasse erstarrte nach dem Eingießen in Eiswasser nach einigen Stunden. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Essigester hatte das Produkt den konstanten Schmelzpunkt 149—150°.

Ein mit Diazetyl-Dimethyl-Skutellarein ausgeführter Mischschmelzpunkt verlief ohne Depression. Die Methoxylbestimmungen ergaben für die Theorie etwas zu niedrige Werte.

Methoxylbestimmungen (nach ZEISEL-PREGL):

1. 3.325 mg Substanz gaben 3.600 mg
2. 3.000 mg „ „ 3.175 mg.

¹² Sitzb. d. kais. Akad. d. Wiss. 1909.

Ber. für $C_{21}H_{18}O_8$: OCH_3 15.57 %.

Gef.: 1. OCH_3 14.31 %.

2. OCH_3 13.98 %.

II. Milder alkalischer Abbau des Aglukons¹³

0.5 g Aglukon wurden mit 30 cm³ 35%iger Kalilauge zwei Stunden lang unter Rückfluß gekocht.

Dann wurde die alkalische Lösung jedesmal rasch abgekühlt und unter Kühlung vorsichtig mit verdünnter Salzsäure angesäuert, hierauf mit Kochsalz gesättigt.

Die angesäuerte Flüssigkeit wurde sechsmal mit Äther ausgeschüttelt (Ätherauszug A) und die ausgeätherte Lösung noch eine Woche lang im Extraktionsapparat mit Äther weiterbehandelt. Durch diese Operation konnte keine wesentliche Menge an Abbauprodukten mehr herausgeholt werden. Die Ausätherung im Scheidetrichter hatte also schon erschöpfende Extraktion herbeigeführt. Der stark dunkel angefärbte Ätherauszug A wurde zur Abtrennung der bei der Ringsprengung entstandenen Säurekomponente je sechsmal mit ganz wenig (!!) einer kalt gesättigten Natriumbikarbonatlösung ausgeschüttelt. Die Ätherlösung A war nach dieser Behandlung nahezu farblos, der Bikarbonatauszug tief dunkelbraun gefärbt.

Die Ätherlösung A, welche nur mehr den phenolischen Anteil enthalten sollte, wurde zur Trockene verdampft und der Rückstand mit wenig Alkohol unter Erwärmen aufgenommen. Hierauf versetzten wir mit Wasser im Überschuß. Es fiel ein weißer Körper flockig aus, der nach dem Filtrieren und Trocknen aus Alkohol und Essigester umgelöst wurde und sich nicht als ein Phenol, sondern laut Analyse als ein Kohlenwasserstoff erwies. Das alkoholische Filtrat vom Kohlenwasserstoff wurde zur Trockene verdampft, mit Äther aufgenommen und filtriert. Nach dem Verdampfen der filtrierten Ätherlösung hinterblieb ein Öl, das sich zwischen 100 und 140° im Hochvakuum destillieren ließ.

Wegen der geringen Ausbeute an analysenreinem Material konnten hievon nur Methoxylbestimmungen gemacht werden.

4.475 mg Substanz gaben 5.607 mg AgJ

1.609 mg " " 1.993 mg AgJ.

Gef.: OCH_3 16.56, 16.37 %.

¹³ VONGERICHTEN, Ber. D. ch. G. 33, S. 2342.

Die nach der Theorie zu erwartende Phenolkomponente konnte trotz genauester Untersuchung der Abbauprodukte nicht gefaßt werden.

Der Bikarbonatauszug wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert und ausgeäthert (Ätherlösung B). Nach dem Verdampfen des Äthers hinterblieb in sehr guter Ausbeute wieder Anissäure.

Kalischmelze von kohlenwasserstofffreiem Aglukon.

Das Aglukon wurde vor der Kalischmelze sechsmal mit je 30 cm³ siedendem Petroläther behandelt und dann erst zum Abbau verwendet.

In diesem Falle konnte kein Kohlenwasserstoff mehr isoliert werden. Die übrigen Abbauprodukte wurden wie oben aufgearbeitet.

III. Reindarstellung und Analytik des Kohlenwasserstoffes.

Im vorigen Abschnitt wurde die Aufarbeitung der Abbauprodukte, darunter auch die Trennung des Kohlenwasserstoffes von diesen geschildert. Dieser Körper fiel bereits aus der konzentrierten, mit Bikarbonatlösung vorher ausgeschüttelten Ätherlösung in farblosen Flocken aus. Die ätherische Mutterlauge wurde für die Weiterverarbeitung zur Trockene verdampft, der Rückstand in möglichst wenig Alkohol aufgenommen und die alkoholische Lösung mit Wasser im Überschuß versetzt, mit verdünnter Salzsäure schwach angesäuert, wonach der restliche Kohlenwasserstoff in gut filtrierbarer Form ausfiel.

Das so erhaltene Rohprodukt zeigte, aus Essigester umkristallisiert, den konstant bleibenden Schmelzpunkt 67—68°.

Die Reinigung durch Auflösen in Petroläther und Fällen der Petrolätherlösung mit überschüssigem Azeton führte zu einem Produkt, das denselben Reinheitsgrad hatte, wie das aus Essigester umkristallisierte.

Der Kohlenwasserstoff ist löslich in Alkohol, Methylalkohol, Äther, Essigester, Chloroform, Petroläther und Benzol. Zur Analyse wurde aus Essigester umkristallisiertes Material verwendet.

In alkoholischer Lösung tritt nach Zufügen von Bromwasser keine Entfärbung ein.

Elementaranalyse:

4.407 g Substanz gaben 13.715 mg CO_2 , 5.665 mg H_2O .

Gef.: CO_2 84.88, H_2O 14.38%.

4.842 mg Substanz gaben 15.40 mg CO_2 , 6.250 mg H_2O .

Ber. für $\text{C}_{31}\text{H}_{64}$: C 85.32, H 14.67%.

Gef.: C 85.28, H 14.44%.

Molekulargewichtsbestimmung nach RAST:

5.5 mg Substanz, in 82.7 mg Kampfer gelöst, gaben eine Depression von 6°.

Ber. für $\text{C}_{31}\text{H}_{64}$: Mol.-Gew. 436.

Gef.: Mol.-Gew. 443.

Der Mischschmelzpunkt mit Hentriakontan aus Tagetes (Fp. 68°) zeigte keine Depression¹⁴.

IV. Entmethylierung des Aglukons.

1.3 g Aglukon wurden in zwei Partien mit je 8 cm³ Jodwasserstoffsäure (Dichte 1.7) zwei Stunden unter Rückfluß gekocht. Die Methoxylgruppen waren nach dieser Zeit vollständig abgespalten, was eine, an gereinigtem Material durchgeführte Mikro-Methoxylprüfung bewies.

Nach erfolgter Entmethylierung wurde die Flüssigkeit mit etwa 20 cm³ schwefeliger Säure versetzt und noch Wasser im Überschuß zugegeben. Es fiel ein gelber Körper aus, der im getrockneten Zustande, mit siedendem Petroläther gewaschen und hierauf durch mehrmaliges Umfällen aus alkoholischer Lösung mit Wasser unter Zusatz von etwas schwefeliger Säure gereinigt wurde. Ausbeute zirka 1.1 g. Zum Schluß wurde das erhaltene getrocknete Produkt mit Azeton, worin es sich schwer löste, mehrmals ausgekocht und die Azetonlösung zur Trockene verdampft. Es hinterblieb ein Produkt von dunkelgelber Farbe, das sich bei 340° zersetzte.

Es war im Hochvakuum zwischen 185—190° unzersetzt sublimierbar. Der Zersetzungspunkt des sublimierten Produktes lag wieder bei 340°.

Der entmethylierte Körper ist in den gebräuchlichsten Lösungsmitteln ziemlich schwer löslich; es kamen in Betracht: Methylalkohol, Äthylalkohol, Essigester, Chloroform. Das Produkt ist unlöslich in Wasser.

¹⁴ KUHN, Z. physiol. Chem. 197, S. 141.

Unter anderen Reaktionen gab es auch die von GOLDSCHMIEDT und ZERNER¹⁵ für Skutellarein charakteristischen Reaktionen (Tabelle). Auch sein Verhalten bezüglich der Löslichkeit war ein Charakteristikum für Skutellarein.

Elementaranalyse:

4.049 mg Substanz gaben 9.372 mg CO₂, 1.260 mg H₂O.

Ber. für C₁₅H₁₀O₆: C 62.93, H 3.49 %.

Gef.: C 63.13, H 3.48.

Reaktionen in alkoholischer Lösung:

Bleiazetat	roter Niederschlag
Zinnchlorür	gelber Niederschlag
Eisenchlorid	rotbraune Färbung
Barytwasser	spinatgrüne Färbung
Kalilauge	rötliche Färbung
Konz. Schwefelsäure	gelbe Lösung m. schwachgrünl. Fluoreszenz

V. Alkalischer Abbau des entmethylierten Produktes.

Dieser wurde unter milden Bedingungen vorgenommen.

Zirka 1 g Material wurde zu einer Lösung von 30 cm³ 35%iger Kalilauge gegeben. Es trat nach kurzem Erhitzen unter Rückfluß stürmische Reaktion unter starkem Aufschäumen ein. Nach zirka 8 Minuten schien die Hauptreaktion vorüber zu sein und es wurde nunmehr noch eine Stunde unter Rückfluß weitergekocht. Die Aufarbeitung der Abbauprodukte geschah auch hier wie im Falle der Abbauversuche beim Aglukon:

Trennung von Säure und Phenol durch Ausschütteln der Ätherlösung mit gesättigter Natriumbikarbonatlösung.

Aus den mit Salzsäure angesäuerten Bikarbonatauszügen wurde durch Ausäthern ein Produkt erhalten, das nach der Sublimation im Hochvakuum bei 140° den Schmelzpunkt 209—210° aufzeigte, der für *p*-Oxybenzoesäure charakteristisch ist. Ein mit *p*-Oxybenzoesäure ausgeführter Mischschmelzpunkt ergab auch tatsächlich keine Depression.

Die mit Bikarbonat ausgeschüttelte Ätherlösung, welche die phenolischen Bestandteile enthält, wurde nach dem Einengen in

¹⁵ Monatsh. Chem. 31, 1919, S. 439, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (IIb) 119, 1919, S. 439.

einem Sublimationsrohr verdampft und hierauf der Hochvakuumsublimation unterworfen. Zunächst wurde zwischen den Temperaturen 90 und 120° gearbeitet. Innerhalb dieses Temperaturintervalls sublimierte ein Stoff, der in zwei Formen auftrat: die eine, kompaktere, bestand aus feinen Nadeln, die andere aus schon mit freiem Auge gut sichtbaren Oktaederkriställchen. Beide Formen erwiesen sich einander identisch und zeigten denselben Schmelzpunkt von 108°, der nach dem Umlösen aus Benzol und Fällen mit Petroläther konstant blieb. Aus Benzol erfolgt die Kristallisation in langen, derben Spießen. Der mit *p-Oxyazetophenon* ausgeführte Mischschmelzpunkt verlief auch wirklich depressionslos.

Der Rückstand nach der Sublimation des eben identifizierten Körpers wurde nun einer weiteren Hochvakuumsublimation unterworfen unter Steigerung der Heiztemperatur bis 200°. Die hierbei erhaltene Fraktion bestand aus braunen, schmierigen Kristallen, die sich nicht näher identifizieren ließen. Jedoch liegt in diesem Umstand nichts Befremdendes, da ja GOLDSCHMIEDT und ZERNER auch das, beim Skutellareinabbau zu erwartende Phenol nicht identifizieren konnten.

VI. Azetylierung des entmethylierten Produktes.

0.06 g entmethyliertes, sublimiertes Aglukon wurde mit 10 cm³ Essigsäureanhydrid und 6 g entwässertem Natriumazetat eine halbe Stunde lang unter Rückfluß gekocht, hierauf mit Wasser versetzt, wobei das Azetylprodukt ausfiel. Nach dem Umfällen aus alkoholischer Lösung mit Wasser und Umkristallisieren aus Essigester hatte das Produkt den Schmelzpunkt 237—238°.

Ein Mischschmelzpunkt mit Skutellareintetraazetat zeigte keine Depression.

Elementaranalyse:

2.955 mg Substanz gaben 6.566 mg CO₂, 1.135 mg H₂O.

Ber. für C₂₃H₁₈O₁₀: C 60.79, H 3.96 %.

Gef.: C 60.60, H 4.29 %.

VII. Methylierung des entmethylierten Produktes.

Diese wurde, wie bei dem Aglukon, mit Diazomethan ausgeführt. Verwendet wurde ein im Hochvakuum sublimiertes Material. Das hierbei erhaltene Produkt erwies sich sowohl mit dem durch Methylierung des Aglukons erhaltenen als auch mit syn-

thetischem Trimethylskutellarein identisch, was durch depressionslos verlaufene Mischschmelzpunkte der genannten Produkte bewiesen wurde.

VIII. Methylierungsversuche; Darstellung des Trimethylproduktes.

1. Methylierung mit *Diazomethan*.

a) Methylierung des durch Umfällen aus Alkohol-Wasser gereinigten Materials.

0.5 g Aglukon, in möglichst wenig Alkohol gelöst, wurden in der Kälte mit ätherischer Diazomethanlösung (erhalten aus Nitrosomethylurethan und methylalkoholischer Lauge) versetzt.

Nach zwölfstündigem Stehenlassen wurde wieder die gleiche Menge Diazomethanlösung zugefügt, wonach keine Stickstoffentwicklung mehr zu beobachten war. Nach abermaligem zwölfstündigem Stehen wurde der Äther abdestilliert und der Rückstand mit heißem Wasser versetzt. Das hierbei ausfallende Produkt wurde filtriert, im Heißwasserexsikkator getrocknet und nach zweimaligem Umkristallisieren aus Essigester in reinem Zustand erhalten.

Honiggelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 188—189°.

Ausbeute zirka 0.1 g an Rohmaterial.

b) Methylierung von sublimiertem Ausgangsmaterial.

Es wurde wie sub a) verfahren, mit der Abänderung, daß das Reaktionsgemisch am siedenden Wasserbad bis zur Trockene eingedampft wurde.

Das zurückbleibende Produkt hatte, einmal aus Methylalkohol und zweimal aus Essigester umkristallisiert, den Schmelzpunkt 188—189°.

2. Methylierung mit *Dimethylsulfat*.

0.5 g Aglukon, gereinigt durch Alkohol-Wasserbehandlung, wurden in möglichst wenig heißem Alkohol gelöst, bei Siedehitze mit 10 cm³ 40%iger Natronlauge und einem Überschuß an Dimethylsulfat versetzt, eine Stunde lang unter Rückfluß am siedenden Wasserbade erhitzt.

Nach dem Erkalten wurde mit dem fünffachen Volumen

Wasser versetzt und zirka 12 Stunden stehen gelassen. Der ausgeschiedene Niederschlag war noch sehr unrein; er wurde daher wieder in Alkohol gelöst, die Lösung mit Wasser im Überschuß versetzt, wonach ein fast reinweiß aussehender Körper ausfiel. Dieser wurde nach erfolgter Filtration und Trocknung aus Alkohol umkristallisiert, hierauf wieder in Alkohol gelöst und mit Wasser ausgefällt. Schließlich wurde dieses Produkt noch zweimal aus Essigester umkristallisiert. Es hatte dann den Schmelzpunkt von 188°.

Die Reindarstellung gestaltete sich bei der Methylierung mit Dimethylsulfat bedeutend verlustreicher als bei der Methylierung mit Diazomethan.

3. Methylierung mit *Methyljodid*.

Die konzentrierte, absolut-methylalkoholische Lösung des Aglukons wurde mit 5 cm³ 10%iger alkoholischer Kalilauge und 10 cm³ Jodmethyl im Einschlußrohr am Bombenwasserbad während zehn Stunden erhitzt.

Das mit Wasser ausgefällte Produkt war aber so unrein, daß eine Reindarstellung infolge des allzu verlustreichen Weges nicht erzielt werden konnte.

Analytik und Vergleich mit synthetischem Trimethylskutellarein.

Verbrennung:

4·698 mg Substanz gaben 11·322 mg CO₂, 2·202 mg H₂O.

Ber. für C₁₈H₁₆O₆: C 65·85, H 4·87 %.

Gef.: C 65·73, H 5·24 %.

Methoxylbestimmungen (nach ZEISEL-PREGL):

2·475 mg Substanz gaben 5·0125 mg AgJ

2·700 mg „ „ 5·475 mg AgJ.

Ber. für C₁₈H₁₆O₆: OCH₃ 28·35 %.

Gef.: OCH₃ 26·75, 26·82 %.

Die gefundenen Werte sind ähnlich den von WESSELY und MOSER angeführten (zirka 27% OCH₃) auch etwas zu tief.

Schmelzpunkt: 188—189°.

Mischschmelzpunkt mit synthetischem Trimethylskutellarein (Fp. 189°) ergab keine Depression.

IX. Darstellung des Trimethylmonoazetylproduktes.

0.02 g Trimethylprodukt wurden eine Viertelstunde lang mit 2 cm³ Essigsäureanhydrid unter Zusatz von 0.5 g wasserfreiem Natriumazetat gekocht. Das Essigsäureanhydrid wurde fast völlig abdestilliert und die letzten Anteile am siedenden Wasserbad unter Zusatz von Alkohol zerstört. Hierauf wurde mit einem Überschuß an Wasser versetzt, wodurch das Azetylprodukt in weißen Flocken ausfiel. Die Flüssigkeit wurde zwölf Stunden stehen gelassen und dann filtriert. Nach dem Trocknen wurde das Produkt in Essigester gelöst, mit Petroläther bis zur bleibenden Trübung versetzt; in kurzer Zeit trat Kristallbildung ein. Nach nochmaliger Behandlung mit Essigester-Petroläther hatte das Azetylprodukt den der Literatur entsprechenden Schmelzpunkt von 167—169°. Ein mit synthetischem Trimethylmonoazetylskutellarein ausgeführter Mischschmelzpunkt ergab keine Depression.

X. Isolierung, Reindarstellung und Identifizierung des Mannits.

Etwas alkoholischer Blütenextrakt wurde im Vakuum bei 60° bis zur Syrupkonsistenz verdampft, hierauf mit ganz wenig Methylalkohol aufgenommen und mit dem doppelten Volumen Petroläther versetzt. Die Flüssigkeit blieb sodann zwölf Stunden an einem kühlen Orte stehen. Schon nach kurzer Zeit trat reichliche Kristallbildung ein; der die Flüssigkeit erfüllende, dichte Kristallbrei wurde filtriert. Dieses Rohprodukt hatte noch von der Mutterlauge her gelbes Aussehen und war nach mehrmaligem Umfällen aus methylalkoholischer Lösung mit Petroläther farblos zu erhalten. Es zeigte schließlich, aus Methylalkohol umkristallisiert, den Schmelzpunkt 164—165°. Mischschmelzpunkt mit analysenreinem Mannit ergab keine Depression.

Analyse:

4.520 mg Substanz gaben 6.510 mg CO₂, 3.034 mg H₂O.

Ber. für C₆H₁₄O₆: C 39.56, H 7.69%.

Gef.: C 39.28, H 7.51.

Darstellung von Tribenzalmannit¹⁶. Ein Gewichtsteil Mannit wurde in zwei Gewichtsteilen Salzsäure (spez. Gew. 1.19) ge-

¹⁶ FISCHER und FAY, Ber. D. ch. G. 28, S. 1979.

löst und zwei Gewichtsteile reiner Benzaldehyd zugegeben, hierauf stark geschüttelt. Die Masse erstarrte bald unter Abscheidung von Tribenzalmannit. Nach mehrstündigem Stehen wurde mit Wasser verdünnt, filtriert und zuerst mit kaltem Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen. Das Produkt wurde aus heißem Azeton umkristallisiert. Schmelzpunkt 218—222°.



Über eine Umlagerung in der Flavonreihe

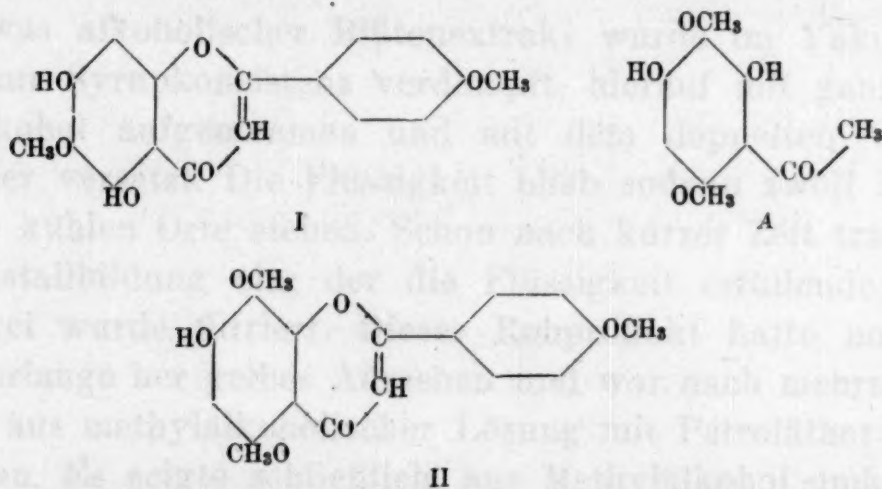
Von

FRITZ WESSELY und FERDINAND KALLAB

Aus dem II. Chemischen Universitäts-Laboratorium in Wien

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. Jänner 1932)

In einer früheren Arbeit¹ wurde über die Synthese des Skutellareins (5,6,7,4'-Tetraflavon) berichtet, das in einer bei ähnlichen Synthesen bisher noch nicht beobachteten Reaktionsweise aus dem 2,4-Dioxy-3,6-Dimethoxyazetophenon (A) durch Kondensation mit Kaliumanisat und Anissäureanhydrid als 6,4'-Dimethyläther (I) erhalten wurde. Eigentlich war aus den genannten Ausgangsmaterialien bei normalem Verlauf der Synthese das 7-Oxy-5,8,4'-Trimethoxyflavon (II) zu erwarten, das aber nur in einem einzigen von acht Versuchen erhalten wurde, obwohl wir bestrebt waren, die Reaktionsbedingungen des einen gelungenen Versuches auch bei zahlreichen anderen einzuhalten.

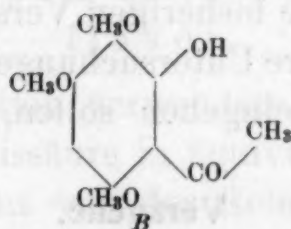


Dieser letztgenannte einmal erhaltene Trimethyläther II zeigte auch bei der Verseifung mit HJ ($D = 1.7$) ein eigentümliches Verhalten, da die Azetylierung des dabei erhaltenen Flavons ein mit dem natürlichen Skutellareintetraazetat identisches Produkt ergab. Es wurde dieser Versuch damals mit der nötigen Reserve mitgeteilt, da er nur einmal und mit wenig Material durchgeführt worden war, und wir waren bestrebt, das genannte Ergebnis durch weitere Versuche zu stützen.

¹ F. WESSELY und G. H. MOSER, Monatsh. Chem. 56, 1930, S. 97, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. (II b) 139, 1930, S. 367.

Zunächst versuchten wir neuerlich die Gewinnung von II aus dem Keton A, Anissäureanhydrid und Alkalianisat. Wie schon oben erwähnt, wäre ja II dabei als normales Reaktionsprodukt zu erwarten. Wir haben keinen Erfolg gehabt. Es wurde diesmal mit Natriumanisat gearbeitet, besonders in Hinblick auf eine uns zur Kenntnis gekommene Arbeit von FURUKAWA². Letztgenannter Autor erhielt aus dem Keton A mit Natriumanisat und Anissäureanhydrid zwei Verbindungen, von welchen die eine mit dem F. P. 279—280° als 7-Oxy-5, 8, 4'-Trimethoxyflavon bezeichnet wird. Daneben erhielt er noch eine zweite Verbindung vom F. P. 255—256°, über die nur angegeben wird, daß sie ebenso wie der vorhin genannte Trimethyläther vom F. P. 279—280° bei der Verseifung mit HJ ein noch nicht bei 330° schmelzendes Flavon liefert, aus dem bei der Azetylierung ein Tetraazetat vom F. P. 245—246° erhalten wird. Dieses Tetraazetat ist wohl, was FURUKAWA allerdings zu bezweifeln scheint, mit dem natürlichen Skutellareintetraazetat identisch, und wir halten es für das Wahrscheinlichste, daß der Trimethyläther vom F. P. 279—280° eine dimorphe Form des von uns beschriebenen Äthers vom F. P. 258° darstellt³. Diesen hatte ja auch FURUKAWA allem Anschein nach in seiner Substanz vom F. P. 255—256° in Händen.

Nach allem diesen schien schon die Arbeit von FURUKAWA eine Stütze der von uns beobachteten Umlagerung zu bedeuten, doch haben wir schon lange vor Kenntnisnahme der genannten Arbeit auf andere Art unsere Versuchsergebnisse gestützt.



Zur Gewinnung von Derivaten von II gingen wir vom Keton B aus, das wir aus 1, 2, 3, 5-Tetramethoxybenzol nach FRIEDEL-CRAFTS erhielten. Durch Kondensation dieses Ketons mit Anissäureanhydrid und Kalium- oder Natriumanisat wurde in allerdings mäßiger Ausbeute ein Tetramethyläther vom F. P. 208° erhalten, der mit dem früher beschriebenen Tetramethyläther,

² FURUKAWA u. H. TAMAKI, Chem. Centr. 1931 (II), S. 2161.

³ Hier sei auch erwähnt, daß das 5, 7-Dioxy-6, 4'-Dimethoxyflavon dimorph ist. Das aus Alkohol umgelöste, bei 218° schmelzende Produkt erstarrt zu bei 204° schmelzenden Kristallen und auch die Sublimation der bei 218° schmelzenden Verbindung führt zu dem Produkt vom F. P. 206°.

der aus II mit Diazomethan dargestellt worden war, Identität zeigte. Es lag also das 5, 7, 8, 4'-Tetramethoxyflavon vor, das ja als normales Reaktionsprodukt zu erwarten war. Während unserer Versuche erschien eine Arbeit von SHIZUO HATTORI⁴, der auf dem gleichen Weg zu dem nämlichen Derivat kommt. In seiner Arbeit erwähnt HATTORI auch unseren Befund über die Umlagerung des dem Trimethyläther (II) zugrunde liegenden Atomgerüsts in Skutellarein, die von uns mit einer verschiedenen Stabilität der den Verbindungen I und II entsprechenden Flavone begründet wurde. Er hält diese Ansicht noch nicht für genügend begründet, weil er aus dem 5, 7, 8, 4'-Tetramethoxyflavon und dem 5, 7, 8-Trimethoxyflavon durch Verseifung mit HJ immer die diesen Äthern zugrunde liegenden Flavone erhielt. Diesen Versuchen stehen nun drei neue von uns durchgeführte Verseifungen des 5, 7, 8, 4'-Tetramethoxyflavons entgegen. Bei zwei Versuchen haben wir mit HJ auf freier Flamme, bei einem dritten im Ölbad auf 140° erhitzt. Es haben sich bei keinem dieser drei Fälle Anzeichen dafür ergeben, daß nennenswerte Mengen von 5, 7, 8, 4'-Tetraoxyflavon in dem rohen Verseifungsprodukt enthalten waren, da diese bei der von HATTORI für das genannte Flavon angegebenen Schmelztemperatur keine Spur einer Veränderung zeigten. Ebenso gewannen wir durch Azetylierung und Methylierung nie andere als die dem Skutellarein entsprechenden Verbindungen.

Wir veröffentlichen, besonders im Hinblick auf HATTORIS Arbeit, schon jetzt unsere bisherigen Versuche und wollen in Gang befindliche umfangreichere Untersuchungen, die auf die Ursache der verschiedenen Befunde eingehen sollen, erst später publizieren.

Versuche.

Synthese des 2-Oxy-3,4,6-Trimethoxyazetophenons.

Als Ausgangsprodukt diente 1, 2, 3, 5-Tetramethoxybenzol (K. P. 148° bei 12 mm Hg), das aus Pyrogalloltrimethyläther über 2, 6-Dimethoxy-1, 4-benzochinon und 2, 6-Dimethoxy-1, 4-dioxybenzol dargestellt wurde.

7.5 g 1, 2, 3, 5-Tetramethoxybenzol und 20 g AlCl₃ wurden fein verrieben und zu diesem Gemisch 18 g Azetylchlorid zutrop-

⁴ S. HATTORI, Acta Phytochimica 5, 1931, S. 219.

fen gelassen. Nach einer Stunde läßt die HCl-Entwicklung nach und man erwärmt zur vollständigen Beendigung der Reaktion im Wasserbad auf 70°. Hierauf trägt man die harzige Masse in Eis ein. Die saure Lösung wird nun ausgeäthert und diese Lösung mit 5% NaOH mehrmals durchgeschüttelt. Durch Einleiten von CO₂ in diese Alkalilösung kann man als erste Fraktion eine Substanz isolieren, die nach mehrmaligem Ausfällen aus Alkalilösung durch CO₂ den F. P. 109—111° zeigt. Sie zeigt sich auch nach den Analysenergebnissen mit dem Keton *B* identisch, welches zuerst von BARGELLINI⁵ erhalten, jedoch in seiner Konstitution erst von S. HATTORI⁶ aufgeklärt wurde.

Ausbeute 3.8 g, F. P. 109—111°.

1.837 mg Substanz gaben 5.705 mg AgJ.

$C_{11}H_{14}O_5 = C_8H_4O(OH)(OCH_3)_3$. Ber.: OCH₃ 41.18%.

Gef.: OCH₃ 41.03%.

Die neben diesem Keton erhaltene zweite Fraktion (CO₂) konnten wir nach BARGELLINI⁵ durch Behandeln der heißen Benzol-lösung mit Ligroin reinigen. Sie scheint mit einem Dimethyläther des Tetraoxyazetophenons identisch zu sein, mit dessen Konstitution wir uns nicht weiter beschäftigt haben.

Ausbeute 0.5 g. F. P. 160—162°.

1.949 mg Substanz gaben 4.335 mg AgJ.

$C_{10}H_{12}O_4 = C_8H_4(OH)_2(OCH_3)_2$. Ber.: OCH 29.25%.

Gef.: OCH 29.39%.

Kondensation zum 5, 7, 8, 4'-Tetramethoxyflavon.

Das zur Kondensation verwendete Alkalianisat stellten wir durch Eintragen von Anissäure in äquivalente Mengen 1 *n*-Lauge dar. Wir überzeugten uns von der Reinheit durch Alkalibestimmungen.

Natriumanisat.

0.0919 g Substanz gaben 0.0367 g Na₂SO₄.

Für C₈H₇O₃Na. Ber.: Na 13.22%.

Gef.: Na 12.93%.

Kaliumanisat.

0.0972 g Substanz gaben

Ber.: K 20.57%.

Gef.: K 20.50%.

⁵ G. BARGELLINI u. L. BINI, Gazz. chim. Ital. 41, 1911, S. 8.

⁶ S. HATTORI, acta Phytochimica 5, 1931, S. 219.

1 g 2-Oxy-3, 4, 6-trimethoxyazetophenon, 1 g Anissäureanhydrid (F. P. 97—99°, dargestellt nach der Thionylchlorid-Pyridinmethode) und 1.2 g Kalium- oder Natriumanisat werden gut vermischt und sechs Stunden auf 180—185° erhitzt. Die Schmelze wird in Alkohol gelöst, mit 10 cm³ einer 20%igen KOH versetzt und 30 Minuten am Wasserbade gekocht. Der Alkohol wird im Vakuum abgedampft und der Rückstand mit Wasser versetzt. Der dabei ausfallende feine Niederschlag wird durch mehrmaliges Umlösen aus Alkohol, zuletzt unter Tierkohlezusatz, gereinigt.

Ausbeute 0.1 g, F. P. 206—207°.

Der Mischschmelzpunkt mit der Substanz, die aus I durch Methylierung mit Diazomethan erhalten wurde, zeigte keine Depression.

2.112 mg Substanz gaben 5.837 mg AgJ, Misch-F.-P. 206°—208°.

$C_{15}H_{18}O_6 = C_{15}H_6O_2(OCH_3)_4$. Ber.: OCH₃ 36.26%.

Gef.: OCH₃ 36.40%.

Aus dem alkalischen Filtrat konnten wir durch Fällung mit CO₂ unser Ausgangsprodukt (2-Oxy-3, 4, 6-trimethoxyazetophenon) zurückgewinnen.

Verseifung des 5, 7, 8, 4'-Tetramethoxyflavons.

0.095 g Tetramethoxyflavon wurden durch einstündiges Erhitzen am Drahtnetz (einmal auch im Ölbad bei 140°) mit 3.5 cm³ HJ (*D* = 1.7) verseift. Nach dem Erkalten behandelt man mit Wasser und mit H₂SO₃. Durch Kristallisation aus Isoamylalkohol kann das Rohprodukt leicht gereinigt werden.

Ausbeute 0.080 g, F. P. (im Berlbloch) über 330°.

Methylierung des erhaltenen Flavons.

Obige Menge (Rohprodukt) wurde in Azeton gelöst und am Wasserbad in fünf Portionen zu je 1 cm³ Dimethylsulfat und 8.5 cm³ 10%igem NaOH methyliert. Nachher wurde die Lösung im Vakuum verdampft und der Rückstand mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen mit Glaubersalz wird das Chloroform verdampft und der Rückstand bei (0.003 mm Hg) 160—170° sublimiert. Das übergehende, kristallinisch erstarrende Öl wird in Alkohol gelöst, der Alkohol verdampft und der Rückstand aus Äther umgelöst.

Ausbeute 0.040 g, F. P. 142°.

Der Mischschmelzpunkt mit dem Tetramethyläther des natürlichen Skutellareins zeigte keine Depression.

Die Schmelze der Substanz vom F. P. 142° zeigte, wie in der ersten Arbeit erwähnt, beim Wiedererstarren und neuerlichem Schmelzen den F. P. 161°.

3·269 mg Substanz gaben 8·519 mg AgJ.

$C_{19}H_{18}O_6 = C_{15}H_6O_2(OCH_3)_4$. Ber.: OCH_3 36·26%.

Gef.: OCH_3 34·43%.

Azetylierung des erhaltenen Flavons.

Durch Azetylierung mit Essigsäureanhydrid und Pyridin oder Essigsäureanhydrid und Natriumazetat wurde das rohe Flavon in seine Tetraazetylverbindung übergeführt. Das erhaltene Rohprodukt wird aus Essigester umgelöst.

Ausbeute quantitativ, F. P. 238°.

Der Mischschmelzpunkt mit dem natürlichen Skutellareintetraazetat zeigte keine Depression.

Der F. P. des Tetraazetates ist, da er nicht ohne Zersetzung verläuft, vom Tempo des Erhitzens abhängig.

Kondensation des 2,4-Dioxy-3,6-dimethoxyazetophenons.

0·72 g 2,4-Dioxy-3,6-dimethoxyazetophenon wurden mit 2·5 g Natriumanisat und 11·5 g Anissäureanhydrid eine Stunde auf 180—185° erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgt ebenso wie bei der Kondensation zum 5,7,8,4'-Tetramethoxyflavon. (Man verwendet zur Verseifung des Anissäureanhydrides die 1½fache theoretische Menge.)

Ausbeute 0·14 g, F. P. (nach einmaligem Umlösen aus Alkohol) 215°.

Der Mischschmelzpunkt mit dem in der ersten Arbeit beschriebenen 5,7-Dioxy-6,4'-dimethoxyflavon zeigte keine Depression.

Der Farbstoff der gelben Dahlien

Von

LEOPOLD SCHMID und ANTON SEEBALD

Aus dem II. Chemischen Universitäts-Laboratorium in Wien

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. Jänner 1932)

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen über die als Anthochlor¹ bezeichneten Blütenfarbstoffe wurde von L. SCHMID und A. WASCHKAU auch der Farbstoff der gelben Dahlien in Arbeit genommen. Das gelbe Dahlienpigment setzt sich nun aus einem Gemenge von zwei Substanzen zusammen, von denen die eine sicher als Apigenin erkannt werden konnte. Gegenstand unserer folgenden Untersuchungen ist der zweite neben Apigenin vorkommende Farbstoff.

Bevor eine chemische Untersuchung überhaupt einsetzen konnte, mußte die Isolierung des Ausgangsmaterials ausgearbeitet werden. Unsere erste Aufgabe bestand darin, den Farbstoff makrochemisch kristallisiert zu fassen. Nach orientierenden Vorversuchen war festgestellt, daß, ähnlich wie bei der Isolierung des Apigenins, auch hier der Alkohol als geeignetstes Lösungsmittel in Betracht komme. Zur Extraktion gelangten zirka 1300 Blütenstände, die aus Gärtnereien Wiens bezogen worden waren. Die von Stengel und Kelch befreiten gelben Blütenblätter wurden in dünner Schicht ausgebreitet und einige Tage hindurch oberflächlich getrocknet; zu langes Lagern zwecks Trocknung war bedenklich, da Spuren einer Zersetzung zu bemerken waren. Bei der Aufarbeitung war besonders auf Fernhalten der grünen Kelchblätter zu achten, die hartnäckig den Blütenblättern anhafteten. Das Pflanzenmaterial wurde nach der oberflächlichen Trocknung einer erschöpfenden, kalten Extraktion mit Alkohol unterworfen, was ungefähr drei Wochen in Anspruch nahm. Das Ende der Extraktion war daran zu erkennen, daß der abfließende Alkohol vollständig farblos war und bei Zusatz von Lauge keine Rotfärbung ergab. Die Art der Rotfärbung mit Lauge ist eine

¹ L. SCHMID und A. WASCHKAU, Monatsh. Chem. 49, 1928, S. 83, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (IIb) 137, 1928, S. 83; L. SCHMID und W. RUMPEL, Monatsh. Chem. 57, 1931, S. 421, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (IIb) 139, 1930, S. 1087; L. SCHMID u. E. KOTTER, Monatsh. Chem., bzw. Sitzb. Ak. Wien (IIb), im Druck.

charakteristische Reaktion des Farbstoffes, aus deren Auftreten auf seine Anwesenheit auch in großer Verdünnung geschlossen werden kann. Die Alkoholextrakte wurden gesammelt und filtriert. Sie waren braun gefärbt und wurden bei einer Temperatur von höchstens 50° im Vakuum auf ein Viertel des Volumens eingeeengt. Diese eingeeengten Extrakte wurden mit dreifachem Volumen Wasser versetzt; dabei fiel ein gelb bis braun gefärbter amorpher Niederschlag aus und die dunkelbraune Lösung hellte sich gleichzeitig auf. Da der Alkohol beträchtliche Mengen von Farbstoff in Lösung hielt, wurde er im Vakuum vollständig entfernt, wobei das Volumen durch Wasserzusatz immer konstant gehalten wurde. Orientierende Vorversuche ergaben, daß es hier nicht wie bei den Anthozyanen möglich sei, den Farbstoff als Salz zu isolieren. Lösung und Niederschlag wurden jetzt getrennt aufgearbeitet. Insgesamt war es möglich, zirka 70 g Niederschlag durch Wasserfällung zu erhalten. Nun handelte es sich darum, dieses Gemisch, das Apigenin und den zu untersuchenden gelben Farbstoff enthielt, zu trennen.

Untersuchungen über die Löslichkeit beider Farbstoffe zeigten den Weg für das Trennungsverfahren. Es beruht auf der Eigentümlichkeit des Apigenins, in absolutem Äther völlig unlöslich zu sein, während der zweite Farbstoff in Äther zwar schwer, aber doch so weit löslich ist, daß auf Grund dessen eine Trennung vom Apigenin möglich ist. Ein geringer Nachteil des Verfahrens liegt wohl darin, daß die Extraktion immerhin längere Zeit erfordert, doch ist es so weit geeignet, daß wir es auch als Darstellung des gelben Dahlienfarbstoffes empfehlen können. Der Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß es doch zu hochwertigem Produkt führt, das sich im weiteren Verlauf leicht in vollständig reines überführen ließ. Um den gelben Farbstoff aus dem Substanzgemisch möglichst restlos herauszuholen, ist es nötig, erstens das Material weitgehend zu trocknen, damit es vom Äther benetzt werden könne, ferner das Rohmaterial in möglichst pulverisierter Form zur Extraktion zu bringen. Bei der Ätherextraktion ging natürlich anfänglich der Farbstoff mit einer Menge leicht löslicher, verunreinigender Begleitstoffe in Lösung. Diese ersten Auszüge waren stark grün gefärbt und mußten verworfen werden. Mit der Dauer der Extraktion traten diese Verunreinigungen immer mehr zurück, so daß die Auszüge reicher an Farbstoff waren. Zur Ätherbehandlung waren zirka 70 g herangezogen worden. Davon fanden sich im Ätherextrakt 16 g. Die Hauptmenge des in Äther

unlöslichen Rückstandes war Apigenin. Die damit vorgenommene Reinigung durch Ätherextraktion war aber noch nicht so weit vorgeschritten, daß der Farbstoff kristallisiert zu fassen gewesen wäre. In dieser Etappe der Aufarbeitung war es naheliegend, den Farbstoff durch Überführung in ihm nahestehende Derivate und Rückgewinnung aus denselben zu fassen. Als solches Derivat eignet sich besonders das Azetylprodukt infolge der azetolytischen Einwirkung des Essigsäureanhydrids auf die Begleitstoffe². Wie weiter unten bei der Beschreibung des Verhaltens des Farbstoffes bei der Azetylierung ausgeführt werden soll, ist die Möglichkeit einer Azetylierung in diesem Falle gar nicht gegeben. Da durch Salzbildung des Farbstoffes weder mit Säuren noch mit Alkalien eine Abtrennung von noch vorhandenen Begleitstoffen möglich war, so mußten wir die mechanische Reinigung weiter fortsetzen. Die oberwähnten 16 g Ätherextrakt wurden behufs Abtrennung der in Äther leicht löslichen Begleitstoffe kurze Zeit mit Äther durchgeschüttelt. Die dunkelgrün gefärbte Ätherausschüttelung wurde abfiltriert und verworfen. Der feste Farbstoff zeigte nun ein reineres Gelb. Die weitere Veredlung des Farbstoffes erfolgte durch wiederholtes Lösen in Alkohol und Ausfällen mit Wasser. In diesem Zusammenhang sei gleichzeitig bemerkt, daß der Farbstoff mit steigendem Reinheitsgrad in Wasser immer schwerer bis praktisch unlöslich wurde, während er in den Rohfällungen in höherem Maße wasserlöslich war.

Nunmehr zeigte der Farbstoff schon das reine Gelb wie die Dahlienblätter. Für den Reinheitsgrad des Farbstoffes sprach auch sein Verhalten gegenüber Lauge; während der reine Körper mit Lauge eine ausgesprochen blutrote Färbung gibt, die mit Säure in Gelb umschlägt, gaben die weniger reinen Produkte eine mehr bräunlichrote Lösung, welche auch fluoreszierte. Nach fünfmaliger Alkohol- und Wasserbehandlung zeigte der Farbstoff beim Erhitzen im Vakuumerschmelzpunktsröhrchen folgendes Verhalten: bis 315° unverändert, von 315—324° allmähliches Braunwerden, 324° beginnende Zersetzung unter Gasentwicklung. Dieses Verhalten blieb konstant auch nach den Versuchen, den Farbstoff aus anderen Lösungsmitteln, wie Azeton, Essigester, Chloroform,

² L. SCHMID und A. WASCHKAU, Monatsh. Chem. 49, 1928, S. 83, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 137, 1928, S. 83; L. SCHMID und K. PIETSCH, Monatsh. Chem. 57, 1931, S. 305, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 971; L. SCHMID und W. RUMPEL, Monatsh. Chem. 57, 1931, S. 421, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 1087.

kristallisiert zu fassen. Es ist für den Farbstoff merkwürdig, daß er aus allen untersuchten Lösungsmitteln nur in kugelförmigen Aggregaten sich ausscheidet, die wohl unter dem Mikroskop völlig homogen aussehen. Das Farbstoffmaterial in schönen Kristallnadeln zu fassen, gelang uns nur durch Sublimation im Hochvakuum. Der Zersetzungspunkt des Farbstoffes zeigte nach Hochvakuumsublimation ganz das gleiche Verhalten wie Farbstoffproben, die nach dem beschriebenen Verfahren dargestellt wurden. Ähnlich verlief der Mischschmelzpunkt des durch Sublimation und des durch Umfällen gereinigten Farbstoffes. Man darf deshalb mit Sicherheit annehmen, daß er einheitlich und nach dem beschriebenen Verfahren rein darzustellen ist. Er ist im Vergleich mit Apigenin in allen Lösungsmitteln viel leichter löslich, besonders im unreinen Zustand. Wir konnten daher nicht verzichten auf die in den Mutterlaugen der ersten Rohfällung verbliebenen Farbstoffmengen, um so mehr als diese noch deutlich die für den Farbstoff charakteristische Färbung mit Lauge zeigten. Die wässrige alkoholische Lösung, die nach Ausfällen des Farbstoffes verblieb, wurde im Vakuum am Wasserbad zur vollständigen Entfernung des Alkohols eingeengt. Dann übertrugen wir das Extraktionsverfahren mit Äther auf in der Lösung verbliebene Anteile, indem in einem Extraktionsapparat diese alkoholfreien Mutterlaugen erschöpfend mit Äther behandelt wurden. Auch bei der Ätherbehandlung der Wasserlösung ergab sich ein ähnliches Bild wie bei der Ätherbehandlung der Rohfällung. Die ersten Partien waren sehr stark grün gefärbt und auch nach mehrfacher Wiederholung der Ätherbehandlung nicht kristallisiert zu fassen, da in ihnen verunreinigende Begleitstoffe in überwiegender Mehrheit vorhanden waren. Erst in den späteren Extrakten war der Farbstoff so weit frei von Begleitstoffen zu gewinnen, daß seine Aufarbeitung auf reinen Farbstoff lohnend war. Es war möglich, rund 5 g Rohextrakt zu erhalten, aus welchem 1 g reiner Farbstoff zu gewinnen war.

Der Farbstoff hatte nach raschem Erhitzen einen Zersetzungspunkt von 324° unter Gasentwicklung. Er war erst im Hochvakuum sublimierbar; Sublimationsbeginn 165° , günstigste Temperatur $170-190^{\circ}$. Seine Farbe ist intensiv gelb, wie sie den gelben Dahlien eigen ist. Außer C, H, O sind keine anderen Elemente am Aufbau des Farbstoffes beteiligt. Methoxyl- und Oxy-methylengruppen waren nicht nachweisbar. Die Verbrennungen ergaben im Durchschnitt die Werte:

C 66.45, H 3.90%,

woraus sich die Bruttoformel $C_{15}H_{10}O_5$ ableitet.

Leicht löslich ist der Farbstoff in Methyl-, Äthylalkohol, Essigester, Eisessig, Azeton, Pyridin, in Lauge mit dunkelkirschroter Farbe, die beim Ansäuern in Gelb umschlägt; in Ammoniak löslich mit hellroter Färbung; schwer löslich in Äther; unlöslich in Wasser, Petroläther, Benzol. Mit Eisenchlorid gibt er in alkoholischer Lösung Braunfärbung, bei Natriumkarbonatzusatz keine Veränderung, mit Bleiazetat keine Reaktion, mit Bromwasser gelben Niederschlag. Die Farbe mit Lauge war blutrot und konnte, wie oben erwähnt, bei der Aufarbeitung als Indikator verwendet werden, weil sie auch in großer Verdünnung auftrat, wobei zu bemerken ist, daß in großer Verdünnung das Blutrot in ein Rötlichgelb übergeht. Die nächste Frage war nun, ob der Farbstoff als Glukosid oder zuckerfrei vorlag. Säurebehandlung des Ausgangsmaterials ließ absolut keinen Zucker erkennen, auch nicht, nachdem die Säurekonzentration auf 10% gesteigert worden war. Das spricht wohl eindeutig dafür, daß wir es nicht mit einem Glukosid zu tun haben, was auch aus dem Umstande hervorgeht, daß der Farbstoff im Hochvakuum sublimierbar ist, was bei einem Glukosid kaum zu erwarten wäre. Die Verbrennungswerte stimmten also auf eine Formel $C_{15}H_{10}O_5$, welche auf Isomerie mit Apigenin eindeutig hinweist. Daß von den Sauerstoffatomen keines als Kristallwassersauerstoffatom zu rechnen ist, konnte leicht bewiesen werden, da das Produkt beim Erhitzen im Hochvakuum bis 130° keine Gewichtsveränderung zeigte und schließlich bei $170\text{--}190^\circ$ unzersetzt sublimierbar ist. Schmelzpunktsbestimmung und Verbrennungswerte stimmten an sublimiertem und an durch Umfällen gereinigtem Produkt völlig überein, so daß ein Kristallwassergehalt oder Zersetzung bei der Sublimation nicht anzunehmen ist. Daß ein Kristallwassergehalt unwahrscheinlich ist, folgt daraus, daß die 10 Wasserstoffatome im Ring gebunden sein müssen, da eine Formulierung von C_{15} und O_4 mit 8 H-Atomen nur schwer vorstellbar wäre. Da der Farbstoff als Begleiter von Apigenin auftritt, da er ferner die gleiche Bruttoformel $C_{15}H_{10}O_5$ wie dieses besitzt, ist er mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls als ein Flavon anzusprechen. Daß er Anthozyan nicht sein kann, folgt schon aus seinem Verhalten gegen Säure und Lauge. Zu denken wäre noch an das Vorliegen eines Anthrachinonfarbstoffes, der auch durch eine gleiche Brutto-

formel zum Ausdruck gebracht werden könnte. Zur Entscheidung dieser Frage wurde nun eine Zinkstaubdestillation versucht, die zu einem Destillat führte, in dem auch nicht spurenweise Anthrazenabkömmlinge zu fassen waren.

Die nächste Aufgabe bestand darin, die Funktion der fünf Sauerstoffatome zu ermitteln. Azetylierungsversuche, die zu dieser Frage Stellung nehmen sollten, zeigten aber einen ganz merkwürdigen Verlauf. Es gelang wohl, auf normale Weise durch Behandlung mit Essigsäureanhydrid ein schön kristallisiertes Produkt vom Schmelzpunkt 178° zu fassen. Dieses vermeintliche Azetylprodukt verhielt sich aber in mehrfacher Weise auffällig. Sehr überraschend war die schlechte Ausbeute, da ja die Azetylierung eine sonst überaus günstig verlaufende Operation ist. Es gelang, aus 5 g Farbstoff nur weniger als 1 g noch unreines Reaktionsprodukt zu erhalten, so daß man überhaupt zweifeln mußte, ein Azetylprodukt in Händen zu haben. Es war nicht möglich, dieses Produkt zum Ausgangsmaterial zu verseifen. Die Azetylbestimmung verlief negativ. Weiter war es merkwürdig, daß keine brauchbaren Analysenwerte zu erzielen waren, da das Produkt trotz eines verhältnismäßig brauchbaren Schmelzpunktes, den es nach mehrfachem Umkristallisieren beibehielt, jeweils nach Umkristallisieren verschiedene Verbrennungswerte ergab, aus denen stöchiometrische Beziehungen nicht abzuleiten waren. Schließlich wurde versucht, unter energischeren Bedingungen zu azetylieren, einerseits durch Ausdehnung der Azetylierungsdauer und zweitens durch Zusatz von geschmolzenem Natriumazetat. Dabei resultierte ebenfalls in nicht einmal 25%iger Ausbeute ein völlig neuer Körper, der schwach gelb war und einen Zersetzungspunkt von $345\text{--}350^{\circ}$ unter Gasentwicklung zeigte. Das Analysenergebnis dieses Reaktionsproduktes ließ auf ein einfach azetyliertes Ausgangsmaterial schließen. Das lag aber nicht vor, weil sich das Ausgangsmaterial durch Verseifen nicht zurückgewinnen ließ. Auf dem Wege der Behandlung mit Essigsäureanhydrid war also eine Ermittlung der Sauerstofffunktion nicht möglich. An ein Studium dieser Reaktion war leider deswegen nicht zu denken, weil die damit verbundenen Materialverluste enorm waren.

Da die Azetylierung keine Entscheidung über den Charakter der Sauerstoffatome zuließ, so wurde die Methylierung versucht. Als Methylierungsmittel benutzten wir Dimethylsulfat. Dabei mußte man mit dem Laugenzusatz vorsichtig verfahren, da die alkalische Reaktion in der Wärme eine Zersetzung des Farbstoffes

verursacht. Unter Zugrundelegung einer Formel von $C_{15}H_{10}O_5$ für das Ausgangsmaterial ergab sich der Methoxylwert 20.59% OCH_3 , was auf das Vorhandensein von zwei methylierbaren Hydroxylgruppen schließen ließ. Auch die Verbrennungswerte ließen eindeutig auf ein Dimethylprodukt schließen. Daß aber tatsächlich drei und nicht zwei freie Hydroxylgruppen vorhanden sind, konnte leicht und eindeutig durch eine ZEREWITINOFF-Bestimmung bewiesen werden. Daß das dritte Hydroxyl bei Methylierung nicht in Reaktion zu bringen ist, ist deswegen nicht überraschend, weil das kein singulärer Fall ist, sondern die gleiche Erscheinung begegnet uns bei Apigenin, bei dem ja auch von drei Hydroxylgruppen nur zwei leicht methylierbar sind, ähnlich bei Skutellarein.

Infolge der Formulierung von $C_{15}H_{10}O_5$, der Existenz von drei Hydroxylgruppen, infolge des Ausbleibens der Karbonylreaktionen war es zwar nicht bewiesen, doch auch nicht ausgeschlossen, daß wir es mit einem Flavon zu tun haben. Es schien uns daher der alkalische Abbau der weitere gegebene Weg, in die Konstitution des Farbstoffes Klarheit zu bringen; um so mehr als Vorversuche mit Mengen von 0.02 g erkennen ließen, daß dabei verschiedene kristallisierbare Körper zu fassen waren. Bei diesem Kaliabbau entstand in der Hauptsache ein saurer Bestandteil und eine Reihe von phenolischen. Diese waren teils durch fraktionierte Vakuumsublimation, teils durch Natriumbikarbonatausschüttelung getrennt worden.

Die Analysen der sauren Verbindung stimmten deutlich auf $C_7H_6O_3$. Ferrichlorid gab einen gelben, amorphen Niederschlag. Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt mit synthetischer *p*-Oxybenzoesäure führte zur Identifizierung dieser Verbindung.

Bei der Aufarbeitung der phenolischen Anteile stellten sich aber unerwartete Schwierigkeiten ein. Es lag nämlich ein Phenolgemisch vor, das der Reihe nach von 70—100° im Vakuum überging. Trennungsversuche durch fraktionierte Kristallisation führten bei dem geringen Materialvorrat auch nicht zum Ziel. Die einzelnen Fraktionen zeigten keinen scharfen Schmelzpunkt, sondern nur ein Schmelzintervall und lieferten stöchiometrisch nicht auswertbare Analysen. Durch verschiedene, hier nicht ausgeführte Trennungsversuche war das vorrätige Material schließlich so weit zusammengeschrumpft, daß eine Identifizierung der Phenole nicht mehr vorgenommen werden konnte.

Die schlechte Ausbeute an Phenol nach dem Abbau des ursprünglichen Farbstoffes bestimmte uns, den Kaliabbau nun-

mehr am methylierten Farbstoff vorzunehmen. Die Spaltung erfolgte mit 20%iger wässriger Kalilauge durch 8stündiges Erhitzen am Wasserbad. In diese Lösung wurde zur Absättigung von Kalilauge Kohlendioxyd eingeleitet. Dabei schied sich eine amorphe Substanz aus, die in Äther aufgenommen wurde. Die Untersuchung dieses Anteiles bereitete aber infolge der Uneinheitlichkeit ähnliche Schwierigkeiten wie die des phenolischen Anteiles nach der Kalischmelze des ursprünglichen Farbstoffes.

Unter den sauren Spaltprodukten war eine Karbonsäure in guter Ausbeute zu isolieren. Löslichkeitsversuche zeigten leichte Löslichkeit in Äther, Alkohol, heißem Wasser, geringe Löslichkeit in kaltem Wasser und Benzol. Nach Umkristallisieren aus Wasser und Sublimieren resultierte ein Produkt vom konstanten Schmelzpunkt 184°. Da nun bei der Kalischmelze des Ausgangsmaterials *p*-Oxybenzoesäure eindeutig nachgewiesen werden konnte, so war die Vermutung nicht unbegründet, daß an dieser Stelle nunmehr deren Methyläther, also die Anissäure vorliege. Schmelzpunkt, Methoxylbestimmung, Verbrennung und Mischschmelzpunkt brachten den schließlichen Beweis dafür.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Farbstoff der gelben Dahlienblüten ein Gemenge von zwei Farbstoffen vorstellt. Der eine dieser beiden ist als das Apigenin aufzufassen. Für die Isolierung des zweiten Farbstoffes konnte ein Weg ausgearbeitet werden. Der Farbstoff kommt zuckerfrei in den Blüten vor. Seine Bruttoformel beträgt $C_{15}H_{10}O_5$. Er ist frei von Kristallwasser und frei von Methoxyl. Die Funktion von zwei Sauerstoffen konnte durch die Darstellung des entsprechenden Methylproduktes als eine phenolische erkannt werden. Auf Grund der Bestimmung der Hydroxylgruppen nach ZEREWITINOFF wurde das Vorhandensein von drei Hydroxylen festgelegt. Durch den Abbau des Farbstoffes konnte der Beweis erbracht werden, daß der Rest der *p*-Oxybenzoesäure am Aufbau dieses Körpers beteiligt ist. Dieser Befund konnte noch dadurch gestützt werden, daß der alkalische Abbau des Methylfarbstoffes zur entsprechenden methylierten *p*-Oxybenzoesäure, zur Anissäure geführt hat. Betreffend die Nomenklatur sind wir der Meinung, daß es nach den bisherigen Versuchen von L. SCHMID und A. WASCHKAU, nach denen der eine Dahlienfarbstoff als ein Flavon erkannt wurde, weiters nach den Erfahrungen an unserem Farbstoff, ferner nach Versuchen von L. SCHMID und KOTTER und L. SCHMID und RUMPEL überflüssig ist, für diese Farbstoffe den Namen *Anthochlor* beizubehalten, über-

flüssig aus dem Grunde, weil sich diese Farbstoffe als Vertreter von Farbstoffgruppen erweisen, deren Stammringsysteme ja seit langem bekannt sind.

Diese Ergebnisse sollen jetzt schon mitgeteilt werden, da die Beschaffung von Pflanzenmaterial und die Aufarbeitung desselben längere Zeit in Anspruch nehmen dürfte.

Beschreibung der Versuche.

Isolierung des Ausgangsmaterials.

Es gelangten rund 1300 Blütenstände von gelben Dahlien, die Skagerrak genannt werden, welche aus Wiener Gärtnereien bezogen wurden, zur Verwendung. Nachdem sie von Stengeln und Kelchblättern befreit waren, wurden sie behufs oberflächlicher Trocknung auf Filtrierpapier ausgebreitet und einige Tage an der Luft trocknen gelassen. Die so vorgetrockneten Blüten wurden in vier Glasstutzen von zirka 10 l Inhalt mit Alkohol übergossen und unter häufigem Umrühren eine Woche stehen gelassen. Das Rühren war zur Zerreißung der Zellengewebe erforderlich, weil dadurch das Eindringen des Alkohols erleichtert wurde. Der Alkoholextrakt war gelbbraun gefärbt. Dieser wurde abgegossen und der dem Rückstande noch anhaftende Alkohol von den Blüten abfiltriert. Diese wurden dann noch dreimal auf gleiche Weise mit Alkohol behandelt, wobei schließlich der dritte Extrakt nur mehr schwach gefärbt war, auch die Blüten erschienen nur mehr schwach gelb. Um die letzten Farbstoffreste hieraus zu gewinnen, wurden alle Blütenrückstände mit 25 l Alkohol versetzt und in einem großen Extraktionsapparat durch fünf Tage mit heißem Alkohol extrahiert. Die nach Abfiltrieren des Alkohols verbliebenen Blütenrückstände zeigten sich nun nahezu farblos. Nach Abdestillieren der Hauptmenge Alkohol wurden auch die durch die letzte erschöpfende Extraktion gewonnenen alkoholischen Farbstofflösungen mit allen übrigen vereinigt. Das Gesamtvolumen aller vereinigten Alkoholextrakte betrug etwa 10 l. Diese wurden nun partienweise im Vakuumwasserbad bei einer Temperatur von 40—50° auf ein Viertel des ursprünglichen Volumens eingeeengt. Die 2½ l wurden in fünf Chargen in einer Vakuumabdampfvorrichtung nach folgender Vorschrift weiterverarbeitet. Die dunkle alkoholische Lösung wurde mit der dreifachen Menge Wasser versetzt, wobei zunächst tiefbraune, später gelbe Schichten von Farbstoff ausfielen. Gleichzeitig hellte sich die Lösung auf. Die wässrige alkoholische Lösung wurde durch

Abdampfen im Vakuum vom Alkohol größtenteils befreit, wobei durch Zutropfenlassen von Wasser das Volumen gleichgehalten wurde. Die wässrige Lösung, welche gelbbraun war, wurde von den ausgefallenen Farbstoffmengen durch Filtration befreit. Diese Rohfällungen von Farbstoff wurden im Vakuum getrocknet. Die Filtrate, welche noch alkoholhaltig waren, wurden auf ein kleineres Volumen eingeeengt. Dabei fielen noch Reste von Farbstoff aus, von denen wieder filtriert wurde. Diese Fraktionen wurden mit den ersten Fällungen vereinigt. Vor und nach der Fällung der alkoholischen Lösung mit Wasser benutzten wir zur Indikation auf Anwesenheit des Farbstoffes sein Verhalten gegenüber Alkalilauge. Es ist nämlich eine charakteristische Eigenschaft des Farbstoffes, in alkalischen Lösungen je nach seiner Konzentration eine intensiv dunkelkirschrote bis in großen Verdünnungen orangegelbe Färbung zu geben. Die wässrigen Mutterlaugen wurden einer gesonderten Behandlung unterworfen. Der durch Wasserfällung erhaltene Rohfarbstoff wurde im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet. Seine Ausbeute betrug rund 70 g. Sie war dunkelgelb bis braun. Von diesen 70 g war aber der größere Teil Apigenin neben Verunreinigungen. Das wurde bereits in der Arbeit von L. SCHMID und A. WASCHKAU³ erwähnt.

Der nunmehr zu isolierende Farbstoff bildete nur den kleineren Teil des Gemenges, wie sich später zeigte nur rund ein Fünftel davon. Da weder Salzbildung noch Fällungsreaktionen des unbekannten Farbstoffes seine Abtrennung vom Apigenin und von den Begleitstoffen ermöglichte, untersuchten wir die Löslichkeitsverhältnisse des Gemenges. Es zeigte sich bei Vorversuchen, daß ein Teil des Gemenges nach längerem Durchschütteln mit absolutem Äther doch in Lösung ging. Die abfiltrierte Äthermenge aber hinterließ einen grüngelben Rückstand, der die starke Laugenreaktion gab, die für den gesuchten gelben Dahlienfarbstoff charakteristisch ist. Diese Beobachtung wurde nun zur Trennung des gelben Dahlienfarbstoffes vom Apigenin benützt. Die Farbstoffmengen der Wasserfällung wurden möglichst fein pulverisiert und in Partien von je 15 g in Soxhletextraktionsapparaten, die $\frac{1}{2}$ l faßten, mit absolut trockenem Äther kalt extrahiert. Die Extraktion einer solchen Partie dauerte bei ganztägigem Arbeiten rund fünf Wochen. Um Feuchtigkeitszutritt zu ver-

³ Monatsh. Chem. 49, 1928, S. 83, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 137, 1928, S. 83.

meiden, wurde ein Chlorkalziumrohr auf den Kühler gesetzt. Da das in der Soxhlethülse vorhandene Material allmählich sich zusammenballte, so wurde es von Zeit zu Zeit herausgenommen und immer wieder zerrieben. Die jeweils zuerst ablaufenden Ätherextrakte waren stark grün gefärbt und wurden nach zirka einstündiger Extraktion wegen der zahlreichen Begleitstoffe als unverwendbar entfernt. Die später erhaltenen Extrakte waren auch noch schwach grünlich. Mit der Dauer der Extraktion steigerte sich die Reinheit des Farbstoffes, bis schließlich ziemlich gelbe Partien als Ätherrückstände zu erhalten waren. Die Ätherextrakte wurden durch Destillation vom Äther befreit und alle Rückstände vereinigt. Die ätherunlöslichen Rückstände waren dunkelbraun, wogen zirka 54 g und zeigten noch immer zwar schwache Rotfärbung mit Lauge. Die extrahierten gelben Farbstoffmengen hatten hingegen noch grünlichen Stich und wogen 16 g. Sie wurden zur Entfernung der Verunreinigungen, welche die Grünfärbung bewirkten, einmal mit 1 l Äther durchgeschüttelt und nach dem Absetzen des Farbstoffes, was ungefähr fünf Minuten dauerte, davon filtriert. Die grüne Ätherlösung wurde verworfen. Der verbliebene, schon ziemlich reingelbe Farbstoff wog rund 15 g. Er zeigte im Vakuumschmelzpunktsröhrchen bei 300° Veränderung unter Braunwerden, bei 310° beginnende Zersetzung mit Gasentwicklung. Zur Erzielung eines noch größeren Reinheitsgrades wurde dieses Produkt, das gegenüber den ersten Partien schon schwerer in Alkohol löslich war, in heißem Alkohol gelöst, bis zur beginnenden Trübung mit warmem Wasser versetzt und abgekühlt. Die so zuerst ausfallenden Partien waren rein hellgelb wie die Dahlienblüten und hatten, nachdem die Fällungen fünfmal wiederholt wurden, einen solchen Reinheitsgrad, daß Schmelzpunktskonstanz erreicht war. Die alkoholischen Lösungen wurden im Vakuum unter Erwärmung auf 50° vom Alkohol befreit, wobei durch eine Kapillare Luft durchgesaugt wurde. Dabei fiel der restliche Farbstoff zum größten Teil aus, der allerdings nicht mehr die ganz reingelbe Farbe der ursprünglichen Dahlienblüten zeigte. Die im Wasser verbleibenden, geringen Farbstoffreste, welche auch noch Unreinigkeiten enthielten, wurden der Ätherextraktion unterzogen, um den restlichen Farbstoff noch zu gewinnen.

Die Aufarbeitung der wässerigen Mutterlaugen, die knapp 1 g Farbstoff ergab, soll nicht weiter beschrieben werden.

Somit hatten wir insgesamt rund 15 g umgefällten Farb-

stoff aus 1300 Dahlienblütenständen isoliert; das entspräche pro Blütenstand einer Menge von rund 0·01—0·02 g, pro Blüte zirka 0·0001—0·0002 g, wobei eine getrocknete Blüte von mittlerer Größe rund 0·01 g wog.

Eigenschaften.

An dem reinen Produkt wurden Kristallisations-, Löslichkeitsversuche, Farb- und Fällungsreaktionen unternommen, die folgendes ergaben. Der Farbstoff ist leicht löslich in Methyl- und Äthylalkohol, Azeton, Essigester, Eisessig, Pyridin, in Lauge mit dunkelkirschroter Farbe, in Säure mit Gelbfärbung, in Ammoniak mit hellroter Farbe; schwer löslich in Äther, unlöslich in Wasser, Petroläther, Benzol. Mit Eisenchlorid gibt er Braunfärbung, bei Natriumkarbonatzusatz keine Veränderung; mit Bleiazetat keine Reaktion, mit Bromwasser gelben Niederschlag. Aus den zur Kristallisation herangezogenen Lösungsmitteln schied sich der Farbstoff immer nur in kugelförmigen, mikroskopisch kleinen Gebilden ähnlich wie Apigenin ab. Diese lagen oft in Aggregaten dicht aneinander. Das Bild unter dem Mikroskop zeigte homogenes Aussehen. Schmelzpunkt war nicht zu beobachten, sondern eine Zersetzung mit folgendem Verhalten: bis 315° keine Veränderung, zwischen 315 und 324° allmähliches Braunwerden, bei 324° beginnende Zersetzung unter Gasentwicklung. Weiteres Umfällen aus Alkohol mit Wasser änderte dieses Verhalten nicht mehr. In makroskopischen Kristallen konnte der Farbstoff nur durch Sublimation erhalten werden. Dies gelang am besten im Hochvakuum bei 0·01 mm Druck und einer Temperatur von 170—180°. Die Sublimation beginnt schon bei 165° und läßt sich ohne Zersetzung bis 210° steigern. Für die Ausbildung schöner Kristalle ist sehr langsame Sublimation bei 180° am günstigsten. Es ergaben sich büschelartig angeordnete, hellgelbe Kristallnadeln von gleichem Schmelzpunktsverhalten wie oben.

Analyse des durch Umfällen aus Alkohol mit Wasser gereinigten Produktes.

3·935 mg Substanz ergaben 9·564 mg CO₂, 1·414 mg H₂O.

Ber. für C₁₅H₁₀O₅: C 66·64, H 3·73%.

Gef.: C 66·29, H 4·02%.

Analyse des im Hochvakuum sublimierten Produktes.

4·010 mg Substanz ergaben 9·799 mg CO₂, 1·362 mg H₂O.

Ber. für C₁₅H₁₀O₅: C 66·64, H 3·73%.

Gef.: C 66·65, H 3·80%.

Analyse des im Kohlensäurestrom sublimierten
Produktes.

4.243 mg Substanz ergaben 10.335 mg CO_2 , 1.480 mg H_2O .

Ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$: C 66.64, H 3.73%.

Gef.: C 66.43, H 3.90%.

Bei Prüfung auf Kristallwasser bei 130° im Hochvakuum bei 0.02 mm Druck blieb die durch Umfällen gereinigte Substanz ohne Gewichtsverlust.

Eine Methoxylbestimmung ergab kein OCH_3 .

Azetylierungsversuch unter milden Bedin-
gungen.

Je 0.5 g Farbstoff wurden in 30 cm³ Essigsäureanhydrid gelöst und am Rückflußkühler zwei Stunden erhitzt. Nach Abdestillieren des Essigsäureanhydrides auf ein Fünftel der Menge wurde der Rückstand mit Alkohol versetzt. Das Auskristallisieren ging langsam vor sich, es dauerte zirka eine Woche, bis die letzten brauchbaren Mengen aus der Mutterlauge zu erhalten waren. Die verschiedenen entsprechenden Fraktionen der Kristallisation wurden vereinigt und neuerdings aus Alkohol umkristallisiert. Erst nach annähernd zehnmaligem Umkristallisieren war ein grauweißes Produkt zu erhalten, das aber noch immer den unscharfen Schmelzpunkt von $172\text{--}174^\circ$ zeigte. Weiteres Umkristallisieren steigerte ihn schließlich auf 178° . Das Produkt war reinweiß und zeigte nadelartige Kristalle. 0.1 g dieses erhaltenen Azetylproduktes wurden in heißem Benzol gelöst und durch Petroläther ausgefällt. Es bildeten sich dabei prachtvolle, lange Nadeln. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das erhaltene Produkt zeigte auch den Schmelzpunkt von 178° . Ein Teil wurde in heißem Toluol gelöst. In der Kälte fiel das Produkt in schönen Nadeln aus. Der Schmelzpunkt des so gewonnenen Produktes lag wieder bei 178° . Die Mutterlauge des Toluols enthielt noch viel Azetylprodukt.

Ein Sublimationsversuch des aus Alkohol umkristallisierten Azetylproduktes zeigte insofern sehr ungünstige Ergebnisse, als das Produkt nur unter teilweiser Zersetzung flüchtig ist. Der Schmelzpunkt ergab nur 176° , wohl deshalb, weil die Substanz unter Sublimation litt.

Analyse des durch Azetylierungsversuch gewonnenen Produktes, welches

I. aus Alkohol umkristallisiert wurde:

4.694 mg Substanz gaben 10.710 mg CO₂, 1.840 mg H₂O.

Gef.: C 62.23, H 4.39%.

II. aus Benzol mit Petroläther ausgefällt wurde:

4.398 mg Substanz gaben 10.102 mg CO₂, 1.655 mg H₂O

3.695 mg „ „ 8.534 mg CO₂, 1.335 mg H₂O.

Gef.: C 62.64, 62.99; H 4.21, 4.04%.

Verseifungsversuche.

0.2 g umkristallisiertes Azetylprodukt wurden zuerst mit 150 cm³ 10%iger alkoholischer HCl gelöst und am Wasserbad mit Rückflußkühler sechs Stunden zur Verseifung gekocht. Die Lösung färbte sich hellgelb, doch zeigte der negative Ausfall der Laugenreaktion an, daß durch die Verseifung der ursprüngliche Farbstoff nicht erhalten worden war. Auch nach zweitägigem Verseifungsversuch mit 20%iger HCl zeigte sich, daß keine Verseifung zum ursprünglichen Farbstoff erreicht wurde.

Eine Mikroazetylbestimmung ergab die Abwesenheit von Azetylgruppen.

Azetylierungsversuche unter verschärften Bedingungen.

Nun wurde das gesamte Azetylprodukt von rund 0.5 g in 250 g Essigsäureanhydrid gelöst, das mit 10 g geschmolzenem Natriumazetat versetzt wurde. Nach vierstündigem Kochen wurde die Lösung auf ein Fünftel eingeeengt, mit doppelter Menge Alkohol versetzt. In der Kälte kristallisierte nach mehreren Tagen ein Teil des erhaltenen Produktes aus. Dieses war gelb und zeigte verändertes Verhalten. Sein Zersetzungspunkt lag oberhalb 335°. Nach öfterem Umkristallisieren stieg dieser auf ein Intervall von 345—350° unter Gasentwicklung und änderte sich nach weiterem Umkristallisieren nicht mehr.

Analyse des unter verschärften Bedingungen azetylierten Produktes.

4.335 mg Substanz gaben 10.400 mg CO₂, 1.515 mg H₂O

4.275 mg „ „ 10.250 mg CO₂, 1.525 mg H₂O.

Gef.: C 65.43, 65.39; H 3.91, 3.99%.

Eine Azetylbestimmung war neuerdings negativ.

Zinkstaubdestillation.

0.1 g durch Umfällen aus Alkohol mit Wasser erhaltener

und getrockneter Farbstoff wurde mit zehnfacher Menge Zinkstaub gut verrieben und im Kohlensäurestrom einer Destillation unter langsamer Temperatursteigerung unterzogen. Hiezu wurde die Substanz in ein 60 cm langes, schwer schmelzbares Glasrohr eingeführt, welches auf der Eintrittsstelle des Kohlensäurestromes mit Glaswolle versehen war. Der getrocknete Kohlensäurestrom wurde langsam durchgeleitet. Behufs genauer Beobachtung des Destillationsproduktes wurden in das Glasrohr zwei lange, schmale Glasstreifen derart eingeschoben, daß der zweite Glasstreifen quer auf dem anderen in T-Form lag und so das destillierte Produkt jederzeit nach Herausnehmen der Glasstreifen im Mikroskop betrachtet werden konnte. Es zeigte sich nun, daß sich bei einer Temperatur von 200—210° ein hellgelbes Sublimat ansetzte, welches schöne Kristallnadeln darstellte. Schmelzpunkt und Verbrennungsergebnisse zeigten Übereinstimmung mit unverändertem im Hochvakuum sublimiertem Farbstoff. Bei Temperaturerhöhung bis zu beginnender Rotglut erfolgte Zersetzung des Farbstoffes mit Gasentwicklung. Unter den Spaltprodukten waren auch nicht spurenweise Anthrazenabkömmlinge zu fassen.

Methylierung des Farbstoffes.

Die Methylierung des Farbstoffes wurde mit Dimethylsulfat durchgeführt. Zunächst wurde 1 g Farbstoff in möglichst wenig, heißem Alkohol gelöst und bei Siedehitze mit 2.4 g Dimethylsulfat und 1.8 g 40%iger heißer Natronlauge versetzt und am Wasserbad am Rückflußkühler eine Stunde gekocht. Nach dem Erkalten wurde die Lösung mit dem dreifachen Volumen Wasser versetzt und zwölf Stunden stehen gelassen. Es zeigte sich ein Niederschlag, von dem filtriert wurde. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol wurde ein schwach gelbes, in büschelartigen Nadeln kristallisiertes Produkt erhalten. Dieses zeigte noch unscharfen Schmelzpunkt von 168—170°, der nach weiterem fünfmaligen Umkristallisieren auf 175½° stieg und konstant blieb. Insgesamt konnten von 5 g Farbstoff rund 0.5 g reines Methylprodukt erhalten werden. Der Methylfarbstoff ist löslich in Methyl- und Äthylalkohol, Essigester und Azeton, etwas schwerer in Äther.

3.959 mg Substanz gaben 6.170 mg AgJ

2.601 mg " " 4.050 mg AgJ.

Ber. für $C_{17}H_{14}O_6$: OCH_3 , 20.81%.

Gef.: OCH_3 , 20.59, 20.57%.

4·000 mg Substanz gaben 9·989 mg CO₂, 1·774 mg H₂O
4·190 mg " " 10·503 mg CO₂, 1·870 mg H₂O.
Ber. für C₁₇H₁₄O₅: C 68·43, H 4·73%.
Gef.: C 68·11, 68·36; H 4·96, 4·99%.

Hydroxylgruppenbestimmung nach ZEREWITINOFF.

Durch wiederholtes Umfällen aus Alkohol mit Wasser gereinigtes Produkt wurde im Hochvakuum bei 0·01 mm Druck und einer Temperatur von 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Als Lösungsmittel für die magnes.-org. Verbindung und für die zu untersuchende Substanz wurde Pyridin verwendet. Zur Ausführung der Bestimmung der Hydroxylgruppen wurden zu nachfolgenden Substanzmengen jedesmal 20 cm³ Pyridin und 5 cm³ CH₃MgJ in der hiezu bestimmten Apparatur nach ZEREWITINOFF in Reaktion gebracht.

Barometerstand 744 mm, Temperatur 23°.

0·1343 g Substanz gaben 34·6 cm³ CH₄.
Ber. für C₁₅H₁₀O₅: OH 18·89%.
Gef.: OH 17·27%.

Barometerstand 744 mm, Temperatur 23°.

0·0922 g Substanz gaben 25·5 cm³ CH₄.
Ber. für C₁₅H₁₀O₅: OH 18·89%.
Gef.: OH 18·41%.

Alkalischer Abbau des Farbstoffes.

Diese Operation wurde viermal mit je 0·5 g Farbstoff, der durch Umfällen aus Alkohol gereinigt worden war, vorgenommen. Je 0·5 g Farbstoff wurden in eine auf 100° vorgewärmte Lösung von 8 g Ätzkali in 3 cm³ Wasser eingetragen, im Wasserstoffstrom rasch auf 220° erhitzt und durch drei Minuten auf dieser Temperatur gehalten. Bei zirka 200° tritt lebhaftes Aufschäumen und Verschwinden der Rotfärbung der Masse ein. Die Schmelze wurde rasch abgekühlt, alle vier Schmelzprodukte vereinigt und dann mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Die angesäuerte Lösung wurde mit Äther fünfmal ausgeschüttelt, dann mit festem Kochsalz bis zur Sättigung versetzt und neuerlich mit Äther erschöpfend ausgezogen. Der Ätherauszug wurde nun mit je 3 cm³ einer gesättigten Natriumbikarbonatlösung im Scheidetrichter sechsmal ausgezogen. Dieser Bikarbonatauszug wurde nun mit 10%iger HCl angesäuert und mit Äther wieder erschöpfend extrahiert. Nach Abdunsten des Äthers wurde ein leicht gelb gefärbter Körper gewonnen. Dieser wurde im Vakuum bei 120° bis

130° sublimiert. Das kristallisierte Sublimat zeigte unscharfen Schmelzpunkt von 165—170°. Insgesamt wurden aus allen Kalischmelzen von zirka 5 g Farbstoff rund 0.4 g Rohprodukt an Säure gewonnen. Nach zehnmaligem Umkristallisieren aus Benzol, verbunden mit dreimaligem Sublimieren, erhielten wir einen Körper, der schließlich einen Schmelzpunkt von 210° zeigte; dieser blieb nach wiederholtem Sublimieren und Kristallisieren konstant.

Analyse:

4.165 mg Substanz gaben 9.304 mg CO₂, 1.520 mg H₂O

3.945 mg „ „ 8.820 mg CO₂, 1.358 mg H₂O.

Ber. für C₇H₆O₃: C 60.65, H 4.36 %.

Gef.: C 60.92, 60.97; H 4.08, 3.85 %.

Ein Mischschmelzpunkt der Abbausäure mit einer synthetisch dargestellten *p*-Oxybenzoesäure, die durch Umkristallisieren aus Benzol und Vakuumsublimation gereinigt worden war, ergab keine Depression.

Schließlich sei eine Analyse erwähnt, welche eine Phenolfraction betrifft, die ein Schmelzpunktsintervall von 85—95° zeigte:

4.430 mg Substanz gaben 11.120 mg CO₂, 2.704 mg H₂O.

Gef.: C 68.46, H 6.83 %.

Eine zweite, die ein solches von 103—108° aufwies, gab:

4.570 mg Substanz gaben 11.223 mg CO₂, 2.655 mg H₂O.

Gef.: C 66.98, H 6.50 %.

Da die Versuche zur Identifizierung der bei dem Kaliabbau entstandenen Phenole zu keinem positiven Ergebnis führten, so wird auch von einer Beschreibung derselben Abstand genommen.

Abbau des methylierten Farbstoffes.

Für den Abbau des zur Verfügung stehenden Methylfarbstoffes von 0.5 g wurden die in der Arbeit von HERZIG (Ber. D. chem. Ges. 42, S. 156) ausgearbeiteten milden Bedingungen gewählt. Die 0.5 g Substanz wurden mit 50 g alkoholischem Kali von 20% durch acht Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Die Lösung wurde mit Wasser versetzt und der Alkohol abdestilliert. Die noch vorher zur Reinigung ausgeätherte Lösung wurde durch Kohlensäureeinleiten neutralisiert. Der Phenolanteil wurde mit Äther ausgezogen, während die in Lösung gebliebene Säure nach Ansäuern mit HCl durch neuerliches Ausäthern gewonnen

wurde. Substanzmangel verhinderte die weitere Untersuchung des Phenols.

Der Säureanteil, welcher nach Ansäuern der phenolfreien Lösung durch Ausäthern gewonnen wurde, ergab eine verhältnismäßig gute Ausbeute an Rohprodukt von 0.1 g. Nach einmaliger Sublimation ergab sich ein unscharfer Schmelzpunkt von 167 bis 172°, der bei weiterem fünfmaligen Umkristallisieren aus Benzol, aus Wasser und darauffolgendem zweimaligen Sublimieren bis 184° stieg und dann konstant blieb. Durch Mischschmelzpunkt mit synthetischer Anissäure, der keine Depression ergab, konnte die Identität des vorliegenden Körpers erwiesen werden. Die Methoxylbestimmung ergab:

2.387 mg Substanz gaben 3.634 mg AgJ.

Ber. für $C_8H_8O_3$: OCH_3 20.40 %.

Gef.: OCH_3 20.11 %.

Verbrennungswerte.

4.213 mg Substanz gaben 9.712 mg CO_2 , 2.056 mg H_2O .

Ber. für $C_8H_8O_3$: C 63.13, H 5.30 %.

Gef.: C 62.87, H 5.46 %.

Die Einwirkung von Ammoniak und Aminen auf die Ester ungesättigter Säuren

I. Die Einwirkung von Ammoniak, Methylamin und Diäthylamin auf Krotonsäureäthylester

Von

KARL MORSCH

Aus dem Chemischen Institut der Universität in Innsbruck

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. Jänner 1932)

Ammoniak und Amine wurden unter verschiedenen Bedingungen auf ungesättigte Säuren und deren Ester einwirken lassen und E. PHILIPPI und E. GALTER¹ haben die gesamte Literatur auf das Verhalten ungesättigter Ester gegen Ammoniak und aliphatische Amine durchgesehen und das erhaltene Material geordnet. E. PHILIPPI, der bereits früher mit seinen Mitarbeitern² auf Grund eigener Erfahrungen und bekanntgewordener Fälle aus der Literatur Regeln aufgestellt hat, nach denen sich die Einwirkung vollzieht, hat in der erstgenannten Arbeit den Einfluß verschiedener Faktoren untersucht, jedoch feststellen müssen, daß bei der Diskussion des Materials, das ihm aus der Literatur zur Verfügung stand und durch eigene Versuche erweitert wurde, der Umstand erschwerend wirkt, daß die verschiedenen Reaktionsbedingungen, unter denen die Versuche angestellt wurden, die konstitutiven Einflüsse, die vor allem den Theoretiker interessieren, verschleiern.

Es lag daher nahe, zu untersuchen, welchen Einfluß die verschiedenen Reaktionsbedingungen haben; auch ist es notwendig, die Einwirkung von Ammoniak und Aminen auf die Ester ungesättigter Säuren unter möglichst gleichen Reaktionsbedingungen zu studieren, denn nur so dürfte es möglich sein, auf die Frage konstitutiver Einflüsse einzugehen und daraus präparativen Nutzen zu ziehen.

Aus diesen Erwägungen heraus wurde eine systematische Untersuchung der Einwirkung von Ammoniak und Aminen auf Ester ungesättigter Säuren in Angriff genommen. In dieser Mit-

¹ E. PHILIPPI und E. GALTER, Monatsh. Chem. 51, 1929, S. 253, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 138, 129, S. 1.

² E. PHILIPPI und E. SPENNER, Monatsh. Chem. 36, 1915, S. 97, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 125, 1915, S. 97.

teilung wird über die Einwirkung von Ammoniak, Methylamin und Diäthylamin, welch letztere als Beispiele primärer und sekundärer Amine gewählt wurden, auf Krotonsäureäthylester berichtet.

Die Einwirkung von Ammoniak und den genannten Aminen auf Krotonester wurde sowohl bei Zimmer- als auch bei erhöhter Temperatur, nach kurzer oder langer Reaktionsdauer, in alkoholischer Lösung und ohne Lösungsmittel untersucht und dadurch der Einfluß von Temperatur, Zeit und Lösungsmittel auf die Reaktion festgestellt. Hiedurch konnte die Einwirkung von Ammoniak und den Aminen auch untereinander verglichen werden.

Da weitere Untersuchungen von Ammoniak und Aminen auf die Ester ungesättigter Säuren, wie Akrylsäuremethylester und Zimtsäureäthylester im Gange sind, soll über allgemeine Erfahrungen und Regeln erst im Anschlusse daran berichtet werden; was jedoch die Einwirkung von Ammoniak, Methylamin und Diäthylamin auf Krotonsäureäthylester betrifft, sei folgendes zusammengefaßt:

Bei Ammoniak gehen Anlagerung und Amidierung der Estergruppe nebeneinander vor sich, doch verläuft die erstere Reaktion bedeutend schneller. Als Anlagerungsprodukt tritt außer dem β -Amino-buttersäure-äthylester der $\beta\beta'$ -Imino-dibuttersäure-diäthylester auf. Die Bildung des ersteren Esters scheint sowohl direkt als auch über den $\beta\beta'$ -Iminodiester³ zu gehen, jedoch ist letzterer nicht nur als Zwischenprodukt, sondern auch als Endprodukt anzusehen, so daß schließlich zwischen den beiden Estern ein Gleichgewicht besteht. β -Amino-buttersäure-amid findet sich anfänglich nur wenig im Reaktionsprodukte und nimmt nach längerer Einwirkungsdauer langsam an Menge zu. Krotonsäureamid konnte nur in Spuren — bei den Versuchen mit flüssigem Ammoniak — festgestellt werden. Die Versuche wurden in absolut-alkoholischer Lösung bei Zimmertemperatur und mit flüssigem Ammoniak bei Zimmertemperatur und bei erhöhter Temperatur vorgenommen.

Auch bei Methylamin gehen Anlagerung und Amidierung nebeneinander vor sich, erstere verläuft ebenfalls schneller und es kann je nach dem Überschusse von Methylamin und der Dauer der Einwirkung β -Methylamino-buttersäure-äthylester als Hauptprodukt und β -Methylamino-buttersäure-methylamid als Nebenprodukt erhalten werden oder umgekehrt. Krotonsäure-methylamid wurde nicht isoliert, auch nicht ein dem $\beta\beta'$ -Imino-dibutter-

³ H. SCHEIBLER, Ber. D. ch. G. 45, 1912, S. 2278.

säure-diäthylester entsprechender $\beta\beta'$ -Methylimino-dibuttersäure-diäthylester. Die Versuche mit Methylamin wurden in absolut-alkoholischer Lösung bei Zimmertemperatur oder ohne Lösungsmittel in der Wärme gemacht.

Anders ist der Reaktionsverlauf bei Diäthylamin. In alkoholischer Lösung bildet sich in der Kälte und in der Wärme der β -Diäthylamino-buttersäure-äthylester; desgleichen tritt Anlagerung an die Doppelbindung ein, wenn man Krotonester mit Diäthylamin ohne Lösungsmittel bei Zimmertemperatur reagieren läßt. Erhitzt man Krotonester mit Diäthylamin ohne Lösungsmittel, so wird die Estergruppe amidiert und es entsteht als Hauptprodukt Krotonsäure-diäthylamid.

Am schnellsten wirkt Methylamin auf Krotonsäureäthylester ein; langsam geht die Reaktion bei Ammoniak und bei Diäthylamin vor sich.

Die Einwirkung von Ammoniak auf Krotonsäureäthylester.

Über die Einwirkung von Ammoniak auf Krotonsäure und deren Ester liegen mehrere Angaben vor. So wurde durch Erhitzen der Säure mit wässrigem Ammoniak auf 130—140° während 6—24 Stunden als Hauptprodukt β -Aminobuttersäure und durch Veresterung der Diäthylester der $\beta\beta'$ -Iminodibuttersäure als Nebenprodukt gewonnen⁴. Die gleichen Reaktionsprodukte bekamen R. STÖRMER und E. ROBERT⁵ durch Belichtung einer Lösung von Krotonsäure in wässrigem Ammoniak an der Quarzlampe bei 40—50° während 3—4 Tagen.

E. PHILIPPI und E. SPENNER⁶ erhielten durch siebenstündiges Erhitzen von Krotonsäureäthylester mit absolut-alkoholischem Ammoniak auf 105—110° 75% β -Aminobuttersäureäthylester und E. PHILIPPI und E. GALTER⁷ durch Stehenlassen von Krotonsäureäthylester mit flüssigem Ammoniak bei Zimmertemperatur während 100 Stunden 55% β -Aminobuttersäureäthylester.

⁴ Ausführliche Literaturangaben siehe E. PHILIPPI und E. GALTER, Monatsh. Chem. 51, 1929, S. 255, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 138, 1929, S. 3.

⁵ R. STÖRMER und E. ROBERT, Ber. D. ch. G. 55, 1922, S. 1038.

⁶ E. PHILIPPI und E. SPENNER, Monatsh. Chem. 36, 1915, S. 103, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 124, 1915, S. 103.

⁷ B. PHILIPPI und E. GALTER, Monatsh. Chem. 51, 1929, S. 261, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 138, 1929, S. 9.

Während bei all diesen Versuchen Anlagerung an die Doppelbindung eintrat, konnte A. MAILHE⁸ zeigen, daß beim Überleiten von Krotonsäureäthylester und Ammoniak über Al_2O_3 oder ThO_2 bei 490—500° die Estergruppe verseift wird und sich als einziges Reaktionsprodukt das Nitril der Krotonsäure bildet.

Die bisherigen Versuche, Ammoniak an die Doppelbindung der Krotonsäure oder deren Ester anzulagern, wurden also entweder unter Druck vorgenommen oder, wenn ohne Druck, so unter Belichtung mit der Quarzlampe. Durch verschiedene Versuche wurde nun festgestellt, daß die Anlagerung von Ammoniak an Krotonsäureäthylester schon durch bloßes Stehenlassen einer Lösung des Esters in absolut-alkoholischem Ammoniak vor sich geht.

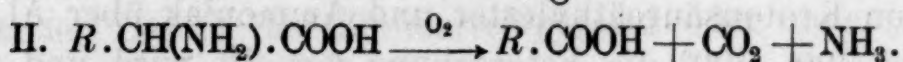
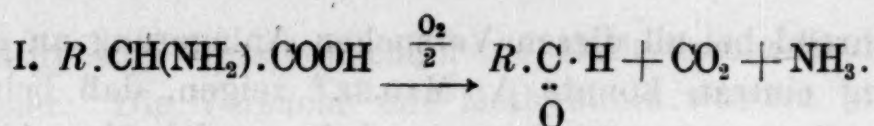
Da bei der Einwirkung von Ammoniak auf Krotonsäureäthylester nur der β -Aminobuttersäureäthylester als Anlagerungsprodukt erhalten wurde, wurde die Untersuchung auf etwaige andere Reaktionsprodukte ausgedehnt, ob sich auch — in Analogie zur Einwirkung von Ammoniak auf Krotonsäure — dabei der $\beta\beta'$ -Imino-dibuttersäure-diäthylester bildet und ob vielleicht außer der Anlagerung an die Doppelbindung auch Amidierung eintritt.

Bei allen Versuchen — sowohl bei der Einwirkung von flüssigem Ammoniak bei Zimmer- und bei erhöhter Temperatur als auch beim Stehenlassen des Esters mit absolutalkoholischem Ammoniak in der Kälte — wurde als Nebenprodukt der $\beta\beta'$ -Imino-dibuttersäure-diäthylester in guter Ausbeute gewonnen. Ferner konnte in beiden Versuchsreihen außer der Anlagerung auch Amidierung festgestellt werden, wenn auch diese nur langsam vor sich geht. So wurde aus dem Reaktionsprodukte β -Aminobuttersäureamid isoliert oder bei Versuchen von kürzerer Dauer als Platindoppelsalz nachgewiesen. Bei der Einwirkung von flüssigem Ammoniak auf Krotonsäureäthylester wurde außerdem Krotonsäureamid in sehr geringer Menge erhalten.

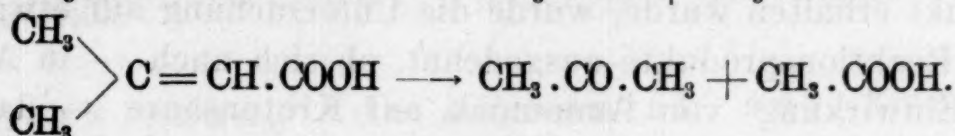
Bei den Versuchen mit flüssigem Ammoniak wurde als Nebenreaktion eine Spaltung des Estermoleküls beobachtet. Bei α -Aminosäuren erhielten H. WIELAND und F. BERGEL⁹ durch Autoxydation Aldehyd bzw. Säure, Kohlendioxyd und Ammoniak nach folgenden Gleichungen:

⁸ A. MAILHE, Bull. soc. chim. (4) 27, S. 226—229; Chem. Centr. 1920, (III), S. 85.

⁹ H. WIELAND und F. BERGEL, Liebigs Ann. 439, 1924, S. 199.



F. FICHTER und H. LABHARDT¹⁰ bekamen durch Erhitzen von Krotonsäure mit Chlorkalziumammoniak auf 230° während 8 bis 10 Stunden 2-Methyl-5-äthylpyridin, das sich aus Aldehydammoniak bei höherer Temperatur bildet, und erklären diese Reaktion durch intermediäre Spaltung der Krotonsäure in Azetaldehyd und Essigsäure. Beim Erhitzen von Dimethylakrylsäure mit Chlorkalziumammoniak auf dieselbe Temperatur erhielten sie symmetrisches Trimethylpyridin, wobei als Zwischenprodukt Azeton und Essigsäure angenommen wird. Essigsäure als zweites Spaltprodukt wurde jedoch nicht isoliert.



Bei der Einwirkung von flüssigem Ammoniak auf Krotonsäureäthylester wurden in geringer Menge Aldehydammoniak und oxamidsaures Ammonium gefunden. Die Bildung dieser Produkte läßt den Schluß zu, daß der Ester durch Ammoniak unter Mitwirkung des Luftsauerstoffes (und der Feuchtigkeit) an der Doppelbindung gespalten wird, wobei als Spaltprodukte Aldehydammoniak und oxamidsaures Ammonium entstehen. Aldehydammoniak ist das von F. FICHTER und H. LABHARDT angenommene Zwischenprodukt bei der Aldehydkollidinbildung aus Krotonsäure durch Erhitzen mit Ammoniak.

VERSUCHE.

A. Einwirkung von Ammoniak auf Krotonsäureäthylester in absolut-alkoholischer Lösung.

Versuchsdauer in Tagen	Unveränderter Krotonester in %	β-Aminobuttersäure- äthylester in %	ββ'-Iminodibuttersäure- diäthylester in %	β-Aminobuttersäure- amid in %	Destillationsrück- stand in %
5	zirka 25	41	14.5	—	2
17	„ 1	55	31.5	+	4
17	„ 2	53	30.0	4	5
33	—	50	24.0	6	7

¹⁰ F. FICHTER und H. LABHARDT, Ber. D. ch. G. 42, 1909, S. 4714.

Die Ausbeuten sind auf die Theorie des angewandten Krotonsäureäthylesters bezogen.

Zu den Versuchen wurden 20 g Krotonsäureäthylester in 100 cm³ bei Zimmertemperatur gesättigtem, absolut-alkoholischem Ammoniak gelöst und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Hauptmenge Alkohol wurde bei gewöhnlichem Drucke abdestilliert, dann der unveränderte Krotonester + β -Aminobuttersäureäthylester durch Vakuumdestillation vom $\beta\beta'$ -Imino-dibuttersäure-diäthylester getrennt. Etwa unveränderter Krotonsäureäthylester wurde vom β -Aminobuttersäureäthylester durch Ausschütteln mit Äther aus salzsaurer Lösung geschieden, die Lösung hierauf mit Ammoniak unter Kühlung alkalisch gemacht, der β -Aminobuttersäureäthylester ausgeäthert und die ätherische Lösung über entwässertem Natriumsulfat getrocknet. Da der β -Aminobuttersäureäthylester mit Wasser mischbar ist, ist oftmaliges Ausschütteln mit Äther notwendig.

Zur Erklärung der Verluste sei bemerkt, daß beim Abdestillieren des Alkohols stets geringe Mengen von Krotonester mitgerissen werden und auch der β -Aminobutteräthylester infolge seiner leichten Verseifbarkeit nicht zur Gänze mit Äther extrahierbar ist.

Der β -Aminobuttersäureäthylester geht bei 10 mm Druck bei 61—62° über. E. FISCHER und G. RÖDER¹¹ fanden Kp._{12.5} 59 bis 60°, G. STADNIKOW¹² Kp.₁₅ 63—65°, E. PHILIPPI und E. SPENNER¹³ Kp.₁₄ 60—61° und E. PHILIPPI und E. GALTER¹⁴ Kp.₁₄ 64—65°.

4.136 mg Substanz gaben 0.400 cm³ N (17°, 713 mm).

Ber. für C₆H₁₃O₂N: N 10.68%.

Gef.: N 10.68%.

Der $\beta\beta'$ -Imino-dibuttersäure-diäthylester geht bei 10 mm Druck bei 138—141° über. G. STADNIKOW¹² gibt als Kp.₁₅ 150 bis 150.5° an.

5.530 mg Substanz gaben 0.298 cm³ N (16°, 715 mm).

Ber. für C₁₂H₂₃O₄N: N 5.71%.

Gef.: N 5.99%.

Aus der $\beta\beta'$ -Imino-dibuttersäure-diäthylester-Fraktion kristallisierten bei Versuchen von länger dauernder Einwirkung des ab-

¹¹ E. FISCHER und G. RÖDER, Ber. D. ch. G. 34, 1901, S. 3756.

¹² G. STADNIKOW, Chem. Centr. 1909 (II), S. 1988.

¹³ E. PHILIPPI und E. SPENNER, Monatsh. Chem. 36, 1915, S. 104, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 124, 1915, S. 104.

¹⁴ E. PHILIPPI und E. GALTER, Monatsh. Chem. 51, 1929, S. 261, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 138, 1929, S. 9.

solul-alkoholischen Ammoniaks auf Krotonsäureäthylester Kristallnadelbüschel neben einem Kristallkuchen aus. Diese wurden abgesaugt, mit absolutem Äther gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet. Die Substanz schmolz trüb bei 71° und wurde bei 79° klar.

Analyse der Kristallnadeln:

4.758 mg Substanz gaben 1.165 cm³ N (16°, 703 mm).

Ber. für C₄H₁₀ON₂: N 27.44 %.

Gef.: N 26.75 %.

Mit Kupfersulfat und Kalilauge gab die Substanz intensive violette Biuretreaktion, die auf das Vorhandensein einer Amino-amido-, Amino-imido- oder Imino-amido-Gruppe im Molekül hinweist¹⁵. Somit handelt es sich um ein verunreinigtes β-Aminobuttersäureamid, was durch die Überführung in das Platindoppelsalz bestätigt wurde.

5.948 mg Substanz gaben 0.503 cm³ N (21°, 712 mm).

Ber. für (C₄H₁₀ON₂)₂·H₂PtCl₆: N 9.12 %.

Gef.: N 9.20 %.

B. Einwirkung von flüssigem Ammoniak auf Krotonsäureäthylester.

Folgende Zusammenstellung gibt über die Reaktionsprodukte Aufschluß. Die Ausbeuten wurden auf die Gewichtsmenge des Endproduktes bezogen.

Auf ein Volumen Krotonsäureäthylester wurde ein halbes Volumen flüssiges Ammoniak im Bombenrohr einwirken lassen.

Die Aufarbeitung erfolgte in verschiedener Weise. Bei den Versuchen 1 a, 1 b, 2 a, 2 b, 5, 6 und 7 wurde das Reaktionsprodukt mit der gleichen Menge Wasser versetzt und daraus der unveränderte Krotonester und die beiden Aminoester mit Äther extrahiert. Die wässrige Lösung wurde im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure eingedunstet. Die Rückstände von den Versuchen bei Zimmertemperatur wurden weiteruntersucht.

Dem Ätherextrakt wurden die basischen Ester mit verdünnter Salzsäure entzogen, die salzsaure Lösung mit Kalilauge oder konz. Ammoniak unter Kühlung alkalisch gemacht, die Basen mit Äther ausgeschüttelt, die ätherische Lösung über entwässertem Natriumsulfat getrocknet und der β-Amino-buttersäure-äthylester

¹⁵ H. SCHIFF, Liebigs Ann. 299, 1898, S. 236.

durch Vakuumdestillation vom $\beta\beta'$ -Imino-dibuttersäure-diäthylester getrennt.

Versuch Nr.	Temperatur	Dauer	Unveränderter Krotonester in %	β -Aminobuttersäure-äthylester in %	$\beta\beta'$ -Imino-dibuttersäure-diäthylester in %	In Wasser gelöst, mit Äther nicht extrahierbar in %	Anmerkung
1 a	Zimmer-temperatur	50 Stunden	31	31·0	17·0	—	—
1 b	"	50 Stunden	—	—	—	24·0	—
2 a	Zimmer-temperatur	100 Stunden	—	59·0	26·5	—	6 % Dest.-Rückstand
2 b	"	100 Stunden	—	—	—	14·5	—
2 c	"	100 Stunden	—	70·0	23·4	—	6 % Dest.-Rückstand
3.	Zimmer-temperatur	40 Tage	—	62·0	27·0	—	6 % Dest.-Rückstand 5 % Aminoamid
4.	Zimmer-temperatur	60 Tage	—	44·0	25·0	—	11 % Dest.-Rückstand 18 % Aminoamid
5.	100°	10 Stunden	—	33·5	22·5	30·5	8 % Dest.-Rückstand
6.	135°	13 Stunden	—	8·0	9·0	70·0	13 % Dest.-Rückstand
7.	155°	13 Stunden	—	Ätherauszug 5 %		86·0	—

Bei den Versuchen 2 c und 3 konnten die Reaktionsprodukte, da unveränderter Krotonester nicht vorhanden war, sogleich durch Destillation im Vakuum geschieden werden; β -Aminobuttersäureamid ging gemeinsam mit dem $\beta\beta'$ -Imino-dibuttersäure-diäthylester über und erstarrte teils im Kühlrohre, teils im Destillate nach einigem Stehen.

Bei dem Versuch 4 wurde das Reaktionsprodukt, um das β -Aminobuttersäureamid in reinem Zustande zu erhalten, zuerst mit der achtfachen Menge absoluten Äthers versetzt, in dem eine syrupöse Flüssigkeit ungelöst blieb. Aus der ätherischen Lösung kristallisierten beim Abkühlen auf $+2^{\circ}$ β -Aminobuttersäureamid in feinen, farblosen Büscheln aus. Die ätherische Lösung wird dekantiert und der Äther abdestilliert. Die weitere Aufarbeitung geschah wie bei den Versuchen 2 c und 3.

Untersuchung der Substanzen, die aus wässriger Lösung mit Äther nicht ausgeschüttelt werden konnten.

Die im Vakuum über Schwefelsäure eingedunstete wässrige Lösung wurde in absolutem Alkohol gelöst und mit absolutem Äther versetzt. Es fiel eine breiige Masse aus, die sich nur mehr wenig in absolutem Alkohol löste. In Methylalkohol aufgenommen und abermals mit absolutem Äther gefällt, wurde die Masse fest. Sie bestand aus farblosen Nadeln und Drusen, reagierte schwach sauer gegen Lackmus und schmolz bei 189—190° unter Aufschäumen.

5.098 mg Substanz gaben 0.620 cm³ N (20°, 713 mm).

Ber. für C₄H₉O₂N: N 13.59%.

Gef.: N 13.29%.

Eigenschaften und Analyse stimmen auf β -Amino-buttersäure, für die H. WEIDEL und E. ROITHNER¹⁶ den Schmelzpunkt 184°, G. STADNIKOW¹⁷ 185—187° und E. FISCHER und R. GROH¹⁸ 188—189° (193—194°, korr.) fanden.

Nach dem Verdunsten des Alkohol-Äther-Gemisches bleibt ein zähflüssiges Öl zurück, das mit Kupfersulfatlösung und Kalilauge Violettfärbung, mit Nickelsulfatlösung und Kalilauge Gelbfärbung gibt. Aus dem Öl wurde — nach dem Reiben der Gefäßwände — eine kleine Menge eines gelben Platinsalzes erhalten, das, aus Wasser umkristallisiert, den Schmelzpunkt 213° unter Zersetzung hat. Nach der Analyse und dem Schmelzpunkte ist es das Chloroplatinat des β -Aminobuttersäureamids.

5.213 mg Substanz gaben 0.424 cm³ N (19°, 721 mm)

6.180 mg „ „ 0.495 cm³ N (13°, 719 mm)

5.540 mg „ hinterließen 1.765 mg Pt.

Ber. für (C₄H₁₀ON₂)₂·H₂PtCl₆: N 9.12, Pt 31.78%.

Gef.: N 9.02, 9.04, Pt 31.86%.

Beim Eindampfen des ätherunlöslichen Sirups auf dem Wasserbade setzen sich an den Wandungen des Becherglases farblose Blättchen ab, die auch durch Sublimation im Vakuum erhalten werden. Sie schmelzen bei 159°.

¹⁶ H. WEIDEL und E. ROITHNER, Monatsh. Chem. 17, 1896, S. 186, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 105, 1896, S. 186.

¹⁷ G. STADNIKOW, Chem. Centr. 1909, (II), S. 1988.

¹⁸ E. FISCHER und R. GROH, Liebigs Ann. 383, 1911, S. 367.

4.760 mg Substanz gaben $0.696 \text{ cm}^3 \text{ N}$ (17° , 710 mm).

Ber. für $\text{C}_4\text{H}_7\text{ON}$: N 16.47%.

Gef.: N 16.08%.

Somit bildete sich in Spuren Krotonsäureamid. R. STÖRMER und H. STOCKMANN¹⁹ stellten Krotonsäureamid durch Eingießen einer gekühlten ätherischen Lösung von Krotonsäurechlorid in verflüssigtes Ammoniak dar und erhielten es als farblose Nadeln vom Schmelzpunkte $159.5\text{--}160^\circ$ nach Umkristallisieren aus Azeton. R. STÖRMER und E. ROBERT²⁰ beobachteten anlässlich der Darstellung von β -Aminobuttersäure durch Belichtung einer Lösung von Krotonsäure in konz. Ammoniak beim Eindampfen der Flüssigkeit im Vakuum ein kristallinisches Sublimat, das aus Krotonsäureamid vom Schmelzpunkte 159° bestand.

β -Aminobuttersäureamid.

Die beim Versuch 4 aus der ätherischen Lösung durch Abkühlen erhaltenen Nadelbüschel wurden mit absolutem Äther gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet. Die Substanz schmilzt bei $73\text{--}74.5^\circ$ und gibt intensive Biuretreaktion.

3.424 mg Substanz gaben $0.872 \text{ cm}^3 \text{ N}$ (24° , 709 mm).

Ber. für $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{ON}_2$: N 27.44%.

Gef.: N 27.31%.

Das β -Aminobuttersäureamid ist hygroskopisch. Zur Darstellung des Chloroplatinates wurde es in Alkohol gelöst und mit Platinchloridchlorwasserstoffsäure versetzt. Es fällt sofort ein eigelber, kristallinischer Niederschlag heraus, der aus wenig heißem Wasser umkristallisiert wurde. Aus dem Filtrate kann durch Hinzugabe von Alkohol, in dem das Platinsalz schwer löslich ist, weiteres Salz gewonnen werden. Der Schmelzpunkt liegt, je nach der Art des Erhitzens, bei $213\text{--}214.5^\circ$ unter Zersetzung.

L. BALBIANO²¹ erhielt das β -Aminobuttersäureamid durch Erhitzen von β -Chlorbuttersäureester mit dem neunfachen Volumen konzentrierten weingeistigen Ammoniaks während zweier Tage auf $70\text{--}80^\circ$ im geschlossenen Gefäße in 10—12%iger Ausbeute als gelbe, gelatinöse Masse, die auch nach längerer Zeit nicht kristallisierte. Er stellte hievon in alkoholischer Lösung das Chloroplatinat in orangefarbenen Tafeln dar, die in Alkohol nur wenig

¹⁹ R. STÖRMER und H. STOCKMANN, Ber. D. ch. G. 47, 1914, S. 1789—1790.

²⁰ R. STÖRMER und E. ROBERT, Ber. D. ch. G. 55, 1922, S. 1038.

²¹ L. BALBIANO, Ber. D. ch. G. 13, 1880, S. 312.

löslich und in Äther unlöslich sind. Aus dem Platinsalz setzte er mit Kalilauge die Base wieder in Freiheit, die sich als syrupöse Flüssigkeit abschied. H. SCHEIBLER und J. MAGASANIK²² wiederholten die Darstellung mit optisch-aktivem Material und erhielten ein völlig inaktives Produkt. W. STEINKOPF und A. WOLFRAM²³ führten ebenfalls den β -Chlorbuttersäureäthylester in das β -Aminobuttersäureamid über und charakterisierten es in der Form seines Chloroplatinates, das sie aus Wasser-Alkohol in hellgelben Nadeln erhielten.

Leichte Verseifbarkeit des β -Amino-buttersäure-äthylesters.

Der β -Amino-buttersäure-äthylester schied beim Aufbewahren einen Kristallkuchen ab, der abgesaugt und mit absolutem Äther gewaschen wurde. Auch das Filtrat war nicht mehr vollständig in Äther löslich. Der ätherunlösliche Rückstand war sirupös und begann nach einiger Zeit auszukristallisieren; die Kristalle wurden ebenfalls abgesaugt und mit absolutem Äther gewaschen. Beide Kristallisationsfraktionen wurden vereinigt, in wenig warmem Methylalkohol gelöst und die Lösung mit absolutem Alkohol versetzt. Es kristallisieren daraus farblose Nadeln vom Zersetzungspunkte 189—190° aus, die sich als β -Aminobuttersäure erwiesen.

4.332 mg Substanz gaben 0.536 cm³ N (22°, 719 mm).

Ber. für C₄H₉O₂N: N 13.59%.

Gef.: N 13.55%.

β -Aminobuttersäure ist in kaltem und warmem Azeton, Chloroform und Benzol schwer löslich.

Der β -Amino-buttersäure-äthylester hatte somit, obwohl er in ätherischer Lösung mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet wurde, noch Wasser zurückgehalten, wodurch er bei bloßem Stehenlassen teilweise verseift wurde. Die Verseifung des Esters beim Aufbewahren blieb daher bei jenen Versuchen aus, bei denen die Aufarbeitung ohne Wasser erfolgte.

Auch die bei der Aufarbeitung des Endproduktes erhaltene β -Aminobuttersäure ist als solche nicht im Reaktionsprodukte

²² H. SCHEIBLER und J. MAGASANIK, Ber. D. ch. G. 48, 1915, S. 1812.

²³ W. STEINKOPF und A. WOLFRAM, Liebigs Ann. 430, 1923, S. 141.

enthalten, sondern entsteht erst beim Versetzen desselben mit Wasser durch Verseifung.

E. FISCHER und H. SCHEIBLER²⁴ stellten β -Aminobuttersäure durch vierstündiges Kochen des Äthylesters mit der zehnfachen Menge Wasser am Rückflußkühler und Eindampfen der wässerigen Lösung dar. Ein Versuch zeigte, daß der Ester bereits beim Eindampfen mit der dreifachen Menge Wasser auf dem Wasserbade vollständig verseift wird und die Säure fast ganz rein zurückbleibt.

Nebenreaktion.

An den Wandungen des Bombenrohres bleibt bei allen Versuchen bei Zimmertemperatur eine farblose, zumeist aber rötlich gefärbte Kristallmasse zurück; diese wird mit Alkohol und Äther gewaschen und hat den Schmelzpunkt 226—227° unter Zersetzung.

4·118 mg Substanz gaben 3·545 mg CO₂, 2·053 mg H₂O

5·058 mg „ „ 1·151 cm³ N (19°, 719 mm).

Ber. für oxamidsaures Ammonium C₂H₆O₃N₂: C 22·63, H 5·70, N 26·41 %.

Ber. für Oxamidsäure C₂H₃O₃N: C 26·96, H 3·40, N 15·73 %.

Gef.: C 23·48, H 5·58, N 25·17 %.

Analyse und Schmelzpunkt weisen auf oxamidsaures Ammonium hin, das durch freie Säure verunreinigt ist.

F. KUTSCHER und M. SCHENCK²⁵ fanden für oxamidsaures Ammonium den Schmelzpunkt 226° unter Zersetzung. Für Oxamidsäure geben H. v. PECHMANN und K. WEHSARG²⁶ Fp. = 210° (u. Z.), DE PAOLINI²⁷ den Zersetzungspunkt 214° an.

Um das zweite Spaltprodukt zu gewinnen, wurde die Reaktionsmasse zuerst bei gewöhnlichem Drucke destilliert, wobei bei einer Badtemperatur von 105—120° einige Tropfen übergehen, die im Kühlrohre zu farblosen Rhomben erstarren, die sich an der Luft bräunen und sich als Aldehydammoniak erweisen. Nach den Angaben im Beilstein²⁸ liegt der Schmelzpunkt von Aldehydammoniak bei 70—80° und der Siedepunkt bei 100°; es kristallisiert in Rhomben, die in Wasser leicht löslich sind.

²⁴ E. FISCHER und H. SCHEIBLER, Liebigs Ann. 383, 1911, S. 341.

²⁵ F. KUTSCHER und M. SCHENCK, Ber. D. ch. G. 37, 1904, S. 2928.

²⁶ F. v. PECHMANN und K. WEHSARG, Ber. D. ch. G. 21, 1888, S. 2990.

²⁷ J. DE PAOLINI, Chem. Centr. 1927, (I), S. 2993.

²⁸ Beilstein, 3. A., 1893, (I), S. 917.

Die Einwirkung von Methylamin auf Krotensäureäthylester.

H. SCHEIBLER und J. MAGASANIK²⁹ erhielten β -Methylaminobuttersäure-methylester durch Einwirkung einer 10%igen alkoholischen Methylaminlösung auf β -Chlorbuttersäure während acht Tagen bei 35° oder durch zweistündiges Erhitzen im Rohr bei 100° und nachfolgende Veresterung. Die Ausbeute der aus dem Ester gewonnenen Säure betrug 20% der Theorie. R. BRECKPOT³⁰ stellte β -Methylamino-buttersäure-äthylester aus β -Methylaminobutyro-nitril, das er nach dem Verfahren von BRUYLANTS³¹ durch Einwirkung von wässriger Methylaminlösung auf Vinylazetonitril bekam, über das Chlorhydrat der Säure in ungefähr 50%iger Ausbeute dar. E. PHILIPPI und E. GALTER³² erhitzen Krotensäureäthylester mit 5 Mol wasserfreiem Methylamin acht Stunden auf 65° und erhielten in geringer Menge β -Methylamino-buttersäure-äthylester und als Hauptprodukt β -Methylamino-buttersäure-methylamid.

Bringt man Krotensäureäthylester mit Methylamin in absolut-alkoholischer Lösung zusammen und läßt sie einige Tage bei Zimmertemperatur stehen, so bilden sich, je nach dem Überschuß von Methylamin und der Einwirkungsdauer, β -Methylamino-buttersäure-äthylester als Hauptprodukt neben wenig β -Methylamino-buttersäure-methylamid oder umgekehrt. Desgleichen entsteht durch achtestündiges Erhitzen von Krotonester mit einem geringen Überschuß von flüssigem Methylamin auf 65° β -Methylamino-buttersäure-äthylester in guter Ausbeute.

Ein $\beta\beta'$ -Methylimino-dibuttersäure-diäthylester, den man in Analogie zur Einwirkung von Ammoniak auf Krotensäureäthylester erwarten könnte, konnte nicht isoliert werden; auch entstand derselbe nicht durch Stehenlassen äquimolekularer Mengen von Krotonester und β -Methylamino-buttersäure-äthylester bei Zimmertemperatur während dreier Wochen, während H. SCHEIBLER³³ beim Aufbewahren äquimolekularer Mengen von Krotonester und β -Amino-buttersäure-methylester $\beta\beta'$ -Imino-dibuttersäure-dimethylester erhielt.

²⁹ H. SCHEIBLER und J. MAGASANIK, Ber. D. ch. G. 48, 1915, S. 1813.

³⁰ R. BRECKPOT, Bull. soc. chim. Belgique 32, 1923, S. 412, Chem. Centr. 1924, (I), S. 1671.

³¹ P. BRUYLANTS, Bull. soc. chim. Belgique 32, 1923, S. 256; Chem. Centr. 1924, (I), S. 1669.

³² E. PHILIPPI und E. GALTER, Monatsh. Chem. 51, 1929, S. 261, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 138, 1929, S. 9.

³³ H. SCHEIBLER, Ber. D. ch. G. 45, 1912, S. 2295.

VERSUCHE.

A. Einwirkung von Methylamin auf Krotonsäureäthylester in absolut-alkoholischer Lösung.

Wendet man auf 10 g Krotonsäureäthylester 10 g Methylamin in 100 cm³ absolutem Alkohol (auf 1 Mol Ester 3.6 Mol Methylamin) an, so erhält man folgende Resultate:

Versuchsdauer in Tagen	β -Methylamino-buttersäure-äthylester in %	β -Methylamino-buttersäuremethyramid in %	Anmerkung
3	47.0	36	4% Dest.-Rückstand
4	54.0	38	4% „ „
5	39.5	48	4% „ „

Die Ausbeuten bei diesen und den folgenden Versuchen sind auf die Theorie des angewandten Krotonesters bezogen.

Läßt man auf 1 Mol Krotonester nur 1.1 Mol Methylamin, z. B. auf 30 g Ester 9.2 g Methylamin, in 100 cm³ absolutem Alkohol einwirken, so bekommt man nach sechs Tagen 89% β -Methylamino-buttersäure-äthylester und 3% β -Methylamino-buttersäuremethyramid.

Die Hauptmenge Alkohol wurde bei gewöhnlichem Drucke abdestilliert. Die Lösung färbt sich gelbbraun. Der unveränderte Krotonester + β -Methylamino-buttersäure-äthylester wird durch Vakuumdestillation vom β -Methylamino-buttersäuremethyramid getrennt. Nicht umgesetzter Ester wurde vom β -Methylamino-buttersäure-ester durch Ausschütteln mit Äther aus salzsaurer Lösung geschieden, die Lösung hierauf mit Ammoniak unter Kühlung alkalisch gemacht, der Methylamino-ester ausgeäthert und die ätherische Lösung über entwässertem Natriumsulfat getrocknet.

Der β -Methylamino-buttersäure-äthylester siedet bei 10 mm Druck bei 64—66° (BRECKPOT³⁰ fand Kp._{12.5} 72°), ist farblos, mischbar mit Wasser, Alkohol, Äther, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Azeton, Benzol, Petroläther und Ligroin.

5.089 mg Substanz gaben 0.444 cm³ N (17°, 713 mm).

Ber. für C₇H₁₅O₂N: N 9.65%.

Gef.: N 9.64%.

Das β -Methylamino-buttersäure-methylamid geht bei 10 mm Druck bei 134—136° über (E. PHILIPPI und E. GALTER³⁴ geben Kp.₅₆ 146° an; offenbar liegt hier ein Druckfehler vor und soll es Kp.₁₆ 146° heißen). Es ist ein farbloses bis schwach gelblich gefärbtes, schweres Öl, mischbar mit Wasser, Alkohol, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Azeton und Benzol, schwer löslich in Petroläther und Ligroin. Frisch destilliert mischt es sich mit absolutem Äther, ist aber nach einiger Zeit in Äther schwer löslich.

3·109 mg Substanz gaben 0·612 cm³ N (18°, 712 mm).

Ber. für C₆H₁₄ON₂: N 21·53%.

Gef.: N 21·63%.

B. Einwirkung von flüssigem Methylamin auf Krotonsäureäthylester.

1 Mol Krotonsäureäthylester wurde mit 1·1 Mol wasserfreiem Methylamin acht Stunden auf 65° erhitzt. Aus dem Reaktionsprodukte konnten neben wenig unverändertem Ester 86·5% β -Methylamino-buttersäure-äthylester und 7% β -Methylamino-buttersäure-methylamid isoliert werden.

Folgendes Beispiel zeigt, daß eine geringe Änderung der Versuchsbedingungen zu ganz anderen Mengen der Reaktionsprodukte führt:

E. PHILIPPI und E. GALTER erhielten, wie bereits oben angegeben, durch achtstündiges Erhitzen des Krotonesters mit 5 Mol wasserfreiem Methylamin auf 65° β -Methylamino-buttersäure-äthylester als geringen Vorlauf und als Hauptfraktion β -Methylamino-buttersäure-methylamid. Bei Wiederholung dieses Versuches nach ebendenselben Angaben — das Bombenrohr wurde nach dem Erhitzen abgekühlt und geöffnet — wurden aus dem Reaktionsprodukte 57% Ester und 40% Methylamid der β -Methylamino-buttersäure gewonnen. Der Unterschied in den Ausbeuten wird vielleicht dadurch zu erklären sein, daß E. PHILIPPI und E. GALTER das Bombenrohr nach dem achtstündigen Erhitzen über Nacht auskühlen ließen und es erst am nächsten Tag öffneten in der Annahme, daß in Analogie zur Einwirkung von Ammoniak auf Krotonester die Reaktion bei Zimmertemperatur sehr langsam verlaufe und daher das Stehenlassen bei Zimmertemperatur keine nennenswerte Änderung der Ausbeuten bewirke.

³⁴ E. PHILIPPI und E. GALTER, Monatsh. Chem. 51, 1929, S. 261, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 138, 1929, S. 9.

Aus dem β -Methylamino-buttersäure-äthylester kristallisierten nach längerem Stehen feine farblose Nadeln vom Schmelzpunkte 86° aus, die sich als β -Methylamino-buttersäure mit 1 H_2O erweisen, ein Beweis für die leichte Verseifbarkeit auch des Methylaminoesters.

6.137 mg Substanz gaben $0.574 \text{ cm}^3 \text{ N}$ (18° , 710 mm).

Ber. für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N} \cdot \text{H}_2\text{O}$: N 10.37%.

Gef.: N 10.25%.

8.867 mg Substanz verloren nach dreitägigem Trocknen im Vakuum über Phosphorpentoxyd 1.172 mg an Gewicht.

Ber. für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N} \cdot \text{H}_2\text{O}$: H_2O 13.33%.

Gef.: H_2O 13.22%.

β -Methylamino-buttersäure.

H. SCHEIBLER und J. MAGASANIK³⁵ erhielten β -Methylamino-buttersäure durch vierundzwanzigstündiges Erhitzen von Krotonsäure mit 25%iger wässriger Methylaminlösung auf 140° in 27%iger Ausbeute oder durch vierstündiges Kochen von β -Methylamino-buttersäure-äthylester mit der zehnfachen Menge Wasser zunächst als Sirup; nach Behandeln mit Methylalkohol und Hinzufügen von warmem Äthylalkohol kristallisierte die Säure nach 24stündigem Stehen im Kühlschranke aus. Die Ausbeute an Säure betrug 20% der Theorie. Analyse und Beschreibung jedoch fehlen.

Zur Darstellung der Säure wurde der β -Methylamino-buttersäure-äthylester mit der dreifachen Menge Wasser am Wasserbade eingedampft und über Nacht auskristallisieren lassen. Die Kristalle wurden in absolutem Alkohol gelöst, mit absolutem Äther gefällt und aus Chloroform umkristallisiert. Ausbeute nahezu quantitativ.

Die Säure kristallisiert mit 1 Mol H_2O in farblosen Nadeln, die bei 86 — 87° schmelzen; sie ist leicht löslich in Methyl- und Äthylalkohol, schwer löslich in Äther und Azeton.

Nach eintägigem Trocknen über Phosphorpentoxyd verliert die Säure das Kristallwasser und schmilzt dann bei 141 — 142° .

8.976 mg Substanz verloren 1.186 mg an Gewicht.

Ber. für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N} \cdot \text{H}_2\text{O}$: H_2O 13.33%.

Gef.: H_2O 13.21%.

Analyse der im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrockneten Substanz:

³⁵ H. SCHEIBLER und J. MAGASANIK, Ber. D. ch. G. 48, 1915, S. 1812 und 1813.

4·561 mg Substanz gaben 0·502 cm³ N (22°, 715 mm).

Ber. für C₅H₁₁O₂N: N 11·96%.

Gef.: N 11·98%.

Die Einwirkung von Diäthylamin auf Kroton- säureäthylester.

Während B. FLÜRSCH³⁶ bereits nach einstündigem Kochen von Akrylsäureester mit einem Überschusse von Diäthylamin β -Diäthylaminopropionsäureester in quantitativer Ausbeute erhielt, geht die Anlagerung von Diäthylamin an Krotonsäureäthylester sowohl ohne Lösungsmittel bei Zimmertemperatur als auch in absolut-alkoholischer Lösung bei Zimmertemperatur und durch Erhitzen am Rückflußkühler langsam vor sich.

Wird Krotonsäureäthylester mit Diäthylamin ohne Lösungsmittel längere Zeit auf 200° erhitzt, so tritt Amidierung der Estergruppe ein und es bildet sich als Hauptprodukt Krotonsäurediäthylamid; β -Diäthylamino-buttersäureäthylester konnte aus dem Endprodukte nicht isoliert werden.

A. Einwirkung von Diäthylamin auf Krotonsäureäthylester in absolut-alkoholischer Lösung.

a) Bei Zimmertemperatur.

Wendet man auf 8 g Krotonester 15 g Diäthylamin in 50 cm³ absolutem Alkohol (auf 1 Mol Ester 3 Mol Diäthylamin) an, so erhält man nach 8 Tagen 11% und nach 20 Tagen 25% β -Diäthylamino-buttersäureäthylester, berechnet auf die Theorie des angewandten Krotonesters.

Läßt man auf 9·5 g Ester 25 g Diäthylamin in 50 cm³ absolutem Alkohol 30 Tage bei Zimmertemperatur einwirken (auf 1 Mol Ester 4 Mol Diäthylamin), so werden 45% β -Diäthylamino-buttersäureäthylester gewonnen.

Bei der Aufarbeitung wurde die Hauptmenge Alkohol und Diäthylamin bei gewöhnlichem Druck abdestilliert und der unveränderte Krotonester entweder durch Vakuumdestillation oder durch Ausschütteln aus salzsaurer Lösung vom β -Diäthylamino-buttersäureäthylester getrennt.

Der β -Diäthylamino-buttersäureäthylester geht bei 10 mm Druck bei 83—84° über.

³⁶ B. FLÜRSCH, J. prakt. Chem. 68, 1903, S. 350.

4·602 mg Substanz gaben 0·312 cm³ N (18°, 713 mm).

Ber. für C₁₀H₂₁O₂N: N 7·48 %.

Gef.: N 7·46 %.

b) Bei erhöhter Temperatur.

Wird Krotonester mit 4 Mol Diäthylamin in absolut-alkoholischer Lösung, z. B. 10 g Ester + 25 g Diäthylamin in 100 cm³ Alkohol, zehn Stunden am Rückflußkühler erhitzt, so werden nach obiger Aufarbeitung 15—20% Diäthylaminoester erhalten.

2·359 mg Substanz gaben 0·162 cm³ N (19°, 722 mm).

Ber. für C₁₀H₂₁O₂N: N 7·48 %.

Gef.: N 7·63 %.

B. Einwirkung von Diäthylamin auf Krotonsäureäthylester ohne Lösungsmittel.

Beim Stehenlassen von Krotonester mit 4 Mol Diäthylamin bei Zimmertemperatur während siebzehn Tagen bildet sich β -Diäthylamino-buttersäure-äthylester in sehr geringer Menge.

Wird Krotonsäureäthylester mit Diäthylamin längere Zeit auf 200° erhitzt, so enthält das Endprodukt basische Produkte, die bei 11 mm Druck von 94—120° überdestillieren.

In folgender Tabelle sind die angewandten Mengen Krotonsäureäthylester und Diäthylamin und die erhaltenen Mengen der Reaktionsprodukte zusammengestellt.

Angewandte Mengen			Versuchsdauer in Stunden	Erhaltene Mengen		
Krotonester in g	Diäthylamin in g	Mol		unv. Krotonester in g	Basen in g	Dest.-Rückstand in g
11	8·2	1:1·15	20	1·3	10·6	0·8
10	15·0	1:2·3	24	0·15	10·8	1·1
10	25·0	1:4·00	50	—	10·9	1·8

Die Hauptmenge der Basen (etwa 75%) siedet bei 11 mm Druck bei 96—104°. Durch dreifache fraktionierte Destillation wurde eine Flüssigkeit vom Kp.₁₃ 100—102° gewonnen, dessen Analyse auf Krotonsäurediäthylamid hinweist.

6·528 mg Substanz gaben 16·384 mg CO₂ und 6·212 mg H₂O

2·237 mg „ „ 0·203 mg N (21°, 715 mm)

2·004 mg „ „ 0·184 mg N (24°, 718 mm).

Ber. für C₈H₁₅ON: C 68·02, H 10·71, N 9·93 %.

Gef.: C 68·45, H 10·65, N 9·91, 9·97 %.

Krotonsäure-diäthylamid ist farblos, färbt sich aber nach einigem Stehen gelb; es löst sich leicht in Wasser, Alkohol, Äther, Petroläther, Ligroin und Chloroform.

Die höher siedenden Destillate haben einen größeren N-Gehalt; wegen der geringen Menge konnten sie nicht fraktioniert und ein einheitliches Produkt nicht isoliert werden.

β -Diäthylamino-buttersäure.

Vierstündiges Kochen des β -Diäthylamino-buttersäure-äthylesters mit der dreißigfachen Menge Wasser am Rückflußkühler, Eindampfen der Lösung und Trocknen des Rückstandes im Vakuum über Phosphorpentoxyd lieferte ein gelblich gefärbtes Produkt, das an der Luft sofort erweichte.

Wurde der Ester mit der hundertfachen Menge Wasser, in der er sich löst, auf dem Wasserbade eingedampft und der Rückstand im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet, so erhält man eine farblose Masse. Diese wurde in absolutem Alkohol gelöst und die Lösung mit absolutem Äther versetzt. Die erste Fällung besteht aus Kristallen und einer gelatinösen Masse. Die Alkohol-Äther-Lösung wurde dekantiert. Aus dieser setzen sich an den Wandungen farblose Kristalldrusen vom Schmelzpunkte $72.5-74.5^\circ$ ab, deren Analyse einen für β -Diäthylamino-buttersäure stimmenden N-Wert ergab.

5.717 mg Substanz gaben $0.466 \text{ cm}^3 \text{ N}$ (21° , 703 mm).

Ber. für $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}$: N 8.80 %.

Gef.: N 8.75 %.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle der Dr.-Alexander-Wacker-Gesellschaft für elektrochemische Industrie, G. m. b. H., München, und insbesondere Herrn Dr. F. KAUFLEDER für die gütige Überlassung von Krotonsäureäthylester bestens zu danken.

Studien zur Biochemie der Leuchtbakterien

I. Der Einfluß von Na- und K-Chlorid und Bromid auf die Lichtentwicklung von *Photobacillus radians*

Von

FRANZ FUHRMANN

Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule in Graz

(Mit 21 Textfiguren und 1 Tafel)

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. Jänner 1932)

Die zahlreichen, aus verschiedenen Meeren stammenden Leuchtbakterien sind durchwegs „halophil“, was infolge des hohen Salzgehaltes des Meerwassers als des natürlichen Standortes dieser Mikroben auch zu erwarten ist. Allerdings stellt das Meerwasser keineswegs eine Flüssigkeit stets gleichbleibender quantitativer Zusammensetzung vor, wenn auch die anorganischen Bestandteile desselben gleich sind. Wie groß diese Schwankungen in den Mengenverhältnissen der Salze sind, zeigt die folgende Zusammenstellung der Grenzwerte in Gramm nach KÖNIG¹, auf 1 l Meerwasser berechnet:

NaCl	5·15 — 29·54	CaSO ₄	0·28 — 5·59
MgCl ₂	0·65 — 4·88	MgSO ₄	0·35 — 2·46
NaBr	Spur — 0·56	CaCO ₃	0·00 — 0·37
MgBr ₂	0·00 — 0·03	MgCO ₃	Spur — 0·21
K ₂ SO ₄	0·00 — 1·81		

Im Zuge der Versuche über das Licht und die Leuchtfähigkeit von Mikroorganismen erschien es wertvoll und notwendig, die Wirkungsweise jener Salze in den Kulturen messend zu verfolgen, die sich entweder im natürlichen Standort, dem Meerwasser, befinden oder letztere in der Wirkungsweise ersetzen können, wenn die vielfach angenommene Vertretbarkeit dieser Verbindungen untereinander tatsächlich zu Recht besteht. Dies bezieht sich in erster Linie auf die Chloride, Bromide und Sulfate der Alkalimetalle *Natrium* und *Kalium*, des Erdalkalimetalls *Kalzium* und des *Magnesiums* und in zweiter Linie auf die Nitrate dieser Elemente. Der vorliegenden ersten Mitteilung seien die Befunde mit den Chloriden und Bromiden des Na und K zugrunde gelegt, wie

¹ J. KÖNIG, Die Chemie der Nahrungs- und Genußmittel 2, S. 1369.

sie unter Verwendung der von mir isolierten Nordseeleuchtbakterie „*Photobacillus radians*“ erhalten worden sind.

Photobacillus radians F u h r m a n n.

Diese Leuchtbakterienart konnte ich oftmals von Nordseefischen des Grazer Marktes reinzüchten, wobei ich ähnlich wie seinerzeit MOLISCH² verfuhr. Vom Schwanzstücke eines Schellfisches schneidet man parallel zur Oberfläche etwa 5 cm im Geviert messende und zirka 2 cm dicke flache Scheiben ab, die mit der Haut nach oben in eine Kochsche Kulturschale gelegt werden, in die 1 cm hoch folgende Lösung gegossen wird:

Meersalz	3·0 g
Pepton	0·5 g
Glyzerin	1·0 g
Wasser	100·0 cm ³

Dieselbe wurde in einer solchen Menge eingefüllt, daß die Fischteile bis zur Hälfte vorragten. Die so beschickten Schalen wurden im Dunklen bei 15° C gehalten. Schon nach zehn Stunden zeigten die vorragenden Fischteile zahlreiche intensiv blaugrün leuchtende Punkte, während die gesamte Flüssigkeitsoberfläche ebenfalls Licht ausstrahlte. Von der Fischeoberfläche wurden nun mit Hilfe des KOCHSCHEN Plattenverfahrens Reinkulturen angelegt. Dazu diente „Fischgelatine“, deren Grundlage Fischfleischwasser bildete, wie es später für die Anlage der Leuchtkulturen beschrieben ist.

Fischfleischwasser	200·0 cm ³
Leitungswasser	100·0 cm ³
Pepton sicc. Witte	1·5 g
Meersalz	9·0 g
Glyzerin	3·0 cm ³
Gelatine	30 g

Mit NaOH wurde die Reaktion stets auf $p_H = 7 - 7.1$ eingestellt.

Für die Weiterzucht verwendete ich „Fischagar“, dessen Zusammensetzung mit jener der Fischgelatine übereinstimmt, nur tritt an Stelle der Gelatine 2% Agar. Die „Fischbouillon“ wird unter Weglassung von Agar bzw. Gelatine hergestellt.

Auf der *Gelatineplatte* bildet *Photobacillus radians* bei Zimmertemperatur runde, milchweiße, bei schräger Beleuchtung wie Tautropfen funkelnde, mäßig dicke Auflagerungen mit allmählich ansteigender Mitte. Die Oberfläche der Kolonien erscheint fein

² H. MOLISCH, Leuchtende Pflanzen, 2. Aufl., Fischer, Jena 1912.

strukturiert, der Umfang scharf begrenzt, wie es Fig. 2 der Tafel zeigt, wo eine 36stündige Oberflächenkolonie bei 30facher Vergrößerung abgebildet ist. Die Gelatine wird *nicht* verflüssigt. Die Kolonien lassen sich, ohne fadenziehend zu sein, leicht mit der Nadel abimpfen.

Die *Gelatinestrichkultur* zeigt nach 24stündigem Wachstum bei 18° C längs des Impfstriches eine zarte, weißliche und stark durchscheinende Auflagerung, die eine wenig wellige, aber scharfe Kontur aufweist. Die Oberfläche erscheint fein strukturiert und feuchtglänzend. Die Auflagerung leuchtet in grünlichblauem Lichte so intensiv, daß das Leuchten schon in zerstreutem Tageslicht bemerkbar wird.

In der *Gelatinestichkultur* tritt längs des ganzen Impfstiches Wachstum ein, während um den Einstich eine zarte, scharf begrenzte, dünne Auflagerung entsteht. Nur die oberen Partien, bis etwa 5 mm in die Tiefe, leuchten.

Eine 24stündige, bei 18° C angewachsene *Agarstrichkultur*, weist längs des Impfstriches eine zirka 1.5 mm breite, mäßig erhabene, aber stark feuchtglänzende Auflagerung auf, die schwach milchweiß und durchscheinend ist. Das Kondenswasser des Agarröhrchens zeigt eine allgemeine Trübung und keine Kahmhaut. Die Beläge lassen sich sehr leicht abimpfen und mangels jedes Fadenziehens mühelos in Flüssigkeiten gleichmäßig verteilen.

Bei der Zucht dieser Bakterienart in „*Fischbouillon*“ entsteht bei 18° C nach 24 Stunden eine allgemeine Trübung ohne Kahmhautbildung. Später setzt sich ein weißlicher Bodensatz in geringer Menge ab.

Im *hängenden Tropfen* untersucht, zeigen die Zellen von *Photobacillus radians* eine *Eigenbewegung*, die unter lebhafter Drehung und förmlichem Überpurzeln vor sich geht. Dabei ist die Fortbewegung langsam und oft stockend. Die Formen der Zellen sind in ein und derselben Kultur verschieden und werden auch von der Art des verwendeten Nährsubstrates wesentlich beeinflußt. Um die Unterschiede der osmotischen Verhältnisse zwischen der Kultur und dem Aufschwemmungsmittel bei der Beobachtung so gering als möglich zu gestalten, diente als solches eine sterile 2.5%ige NaCl-Lösung oder *Fischbouillon*.

Die auf schräg erstarrtem *Fischagar* bei 18° C in 24 Stunden gewachsenen Bakterien waren, im *hängenden Tropfen* beobachtet, wie oben angegeben, beweglich und zeigten verschiedene Formen

von kurzen, plumpen, an den Enden abgerundeten Stäbchen bis zu verbreiterten und spindelig ausgewachsenen Gestalten. Fig. 1 der Tafel stellt ein Photogramm vom Rande eines solchen hängenden Tropfens vor, der mit verdünnter Jodlösung behandelt war. Man sieht hier alle Übergänge von den Kurz- zu den Langformen. Dieselbe Vielförmigkeit zeigen auch die mit Methylenblau oder Karbolfuchsin gefärbten *Ausstrichpräparate*, die in den Fig. 3 und 4 der Tafel wiedergegeben sind. Jedenfalls sind diese Formen als normal zu betrachten und gehören in den *Entwicklungskreis* des *Photobacillus radians*. Ich möchte an dieser Stelle besonders darauf hinweisen, daß ich Ähnliches bereits im Jahre 1906 an anderen Bakterienarten beobachtete und darüber auf der 78. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Stuttgart und in Publikationen³ berichtete, ohne daß später bei der Neubearbeitung der Entwicklungskreise von Bakterien von anderer Seite davon Notiz genommen worden wäre. Sowohl in den gefärbten als auch ungefärbten Präparaten erscheinen die Zellen selten homogen, sondern enthalten verschiedene lichtbrechende und färbbare Granula, die sich auch Jodlösungen gegenüber abweichend verhalten.

Dies gilt in erster Linie für zarte Färbungen mit wässriger Methylenblaulösung, wodurch diese Inhaltskörper besonders deutlich zur Ansicht gelangen.

Auch die Kolonien auf der *Gelatineplatte* sind durchaus nicht von formgleichen Bakterienzellen aufgebaut, sondern enthalten ebenfalls verschiedengestaltige Mikroben, wenn auch hier die Vielförmigkeit weniger ausgeprägt ist. Fig. 5 der Tafel gibt einen guten Einblick in die Formenverhältnisse einer 72stündigen Kolonie auf neutraler Gelatine. Der mit Methylenblau gefärbte Abklatsch zeigt im allgemeinen schlankere, an den Enden leicht verjüngte Stäbchen, die vielfach an Schraubenformen anklingen, was besonders für die im Teilungsstadium befindlichen verlängerten Zellen zutrifft. Vergleicht man damit die Formen der Fig. 4 der Tafel, so fällt dieser allgemeine Unterschied besonders auf. Es wird dadurch die vielfach bestätigte Annahme, daß auf oder in besonders feuchten oder flüssigkeitsreichen Nährsubstraten die kurzen, in wasserärmeren und zäheren Medien, wie Gelatine, die längeren und schlankeren Formen entstehen, neuerdings bestätigt.

³ F. FUHRMANN, Entwicklungszyklen von Bakterien. Die Umschau, 10. Jahrgang, 41, 1906; derselbe: Entwicklungszyklen bei Bakterien, Beihefte zum Botan. Zentralblatt 23, 1907, Abt. 1.

Besonders verdickte und spindelig verlängerte Stäbchen zeigen noch die Fig. 6, 7 und 8 der Tafel, wo neben Kurzstäbchen in verschiedenen Übergängen zu Langstäbchen auch auffallend vergrößerte Gestalten zu sehen sind. In Fig. 9 der Tafel sind Formen nach Methylenblaufärbung sehr stark vergrößert gezeichnet wiedergegeben, die Teilungsstadien von *Photobacillus radians* und besondere Umformungen im Zuge der Entwicklung betreffen. Neben fast kugeligen Entwicklungsstadien finden sich stäbchenartige Oidien und stark verlängerte und verdickte Formen mit gut definierten Innenstrukturen. Darauf soll hier aber nicht näher eingegangen werden.

Photobacillus radians ist sonach ein *lichterzeugendes Stäbchenbakterium* mit wenig lebhafter Eigenbewegung, das Gelatine nicht verflüssigt. Diese Bakterienart vermag sich auch fakultativ anaerob zu entwickeln, leuchtet aber nur bei Zutritt des Luft-sauerstoffes.

Photobacillus radians hat sein Wachstums- und Leuchtopotimum zwischen 15 und 18° C, während dafür das Maximum bei zirka 28° und das Minimum bei etwa 6° C liegt.

Diese Bakterienart zeigt die beste Entwicklung und das stärkste Leuchten bei einer Reaktion des Nährsubstrates entsprechend $p_H = 7.1-7.4$, wobei aber auch noch andere Faktoren, wie insbesondere die Temperatur, die Zusammensetzung des Nährbodens und der Salzgehalt, mitspielen.

Versuchstechnik.

Es lag nahe, für die einzelnen Versuchsreihen eine Nährlösung konstanter, einheitlicher und einfacher Zusammensetzung zu verwenden. In dieser Hinsicht bieten die Leuchtbakterien der Nordsee aber Schwierigkeiten, da es bislang nicht gelungen ist, dieselben auf Lösungen bekannter einfacher Stickstoffverbindungen zur Entwicklung zu bringen. BEIJERINCK⁴ reiht diese Bakterien in die Gruppe der „Peptonmikroben“ und „Peptonkohlenstoffmikroben“ ein, was besagt, daß sie zur Erhaltung ihres Lebens als Stickstoffquelle peptonisierte Eiweißstoffe und peptonartige Nährstoffe unbedingt benötigen, im letzteren Fall dazu noch besondere Kohlenstoffquellen. Jedenfalls darf nach den Erfahrungen BEIJERINCK'S Pepton im Nährmedium niemals fehlen. Damit ist aber

⁴ M. W. BEIJERINCK, Die Leuchtbakterien der Nordsee im August und September. Folia Microbiologica, Delft, 4. Jahrgang, 1916.

schon die Unmöglichkeit gegeben, eine tatsächlich einheitliche und chemisch wohldefinierte Nährlösung für diese Photobakterien, zu denen auch *Photobacillus radians* gehört, herzustellen. Es mußten Fischfleischabkochungen herangezogen werden, die in besonderem Maße jene noch unbekannten *N*-Verbindungen enthalten, die für die Ernährung der Leuchtmikroben besonders nützlich sind. Es sei bereits hier erwähnt, daß aussichtsreiche Versuche im Gange sind, diese im Fischfleisch besonders reichlichen Verbindungen in wirksamer Form isoliert zu erhalten, über die in einer späteren Mitteilung besonders berichtet werden soll.

Da Leuchtbakterien sehr leicht von Seefischstücken zu isolieren sind, wurde das Seefischfleisch als Ausgangsmaterial für die Nährlösungen verwendet.

Um sowohl das *Wachstum* als auch die *Leuchtstärke* in den einzelnen Versuchsreihen messend verfolgen zu können, wurden stets „*Flüssigkeitskulturen*“ verwendet, für die als Ausgangsmaterial eine „*Stammbouillon*“ folgender Herstellung und Zusammensetzung diente:

Zur Bereitung des *Fleischwassers* wurde 1 kg von Haut und Eingeweiden befreites Seefischfleisch mit 1 l dest. Wasser zwei Stunden lang im Dampftopf gekocht, erkalten gelassen und dann durch ein Sehtuch filtriert. Die *Stammbouillon* bestand in einer Lösung von 2% Pepton in dem oben geschilderten Fleischwasser, die mit NaOH auf den p_H -Wert 7—7.1 gebracht, dann mit Eiklar geklärt, filtriert und in Erlenmeyer-Kolben in Portionen von je 100 cm³ steril aufbewahrt wurde, um für alle Versuche die gleiche Stammlösung zur Verfügung zu haben. Für die einzelnen Kulturen wurde diese Stammbouillon mit den entsprechenden Zusätzen derart versehen, daß eine in allen Versuchsreihen gleiche Nährmittelkonzentration bei gleichzeitiger Variation der zugesetzten Salzmenge erreicht wird.

Die verwendeten *Salze* wurden auf ihre chemische *Reinheit* nach den üblichen Methoden geprüft und davon zweifach normale Lösungen in destilliertem Wasser hergestellt.

Die *Bestimmung der Leuchtstärke* der einzelnen Kulturen nach gewissen Wachstumszeiten bei der Temperatur von 16° C geschah mit Hilfe der *Schwärzung* einer *hochempfindlichen* photographischen Platte, wobei in bezug auf die Belichtung solche Zeiten gewählt wurden, daß die *Schwärzung in den geraden Ast der Schwärzungskurve* fiel. Ich benützte zur Belichtung einen

Apparat, der die gleichzeitige Aufnahme von sechs Kulturröhrchen gestattet. Derselbe ist in Fig. 1 mit ausgezogenem Schieber und abgenommener Verschlusswand wiedergegeben. Er besteht im wesentlichen aus einem Holzklotz mit sechs nebeneinanderliegenden Bohrungen zur Aufnahme der Kulturröhrchen und ebenso

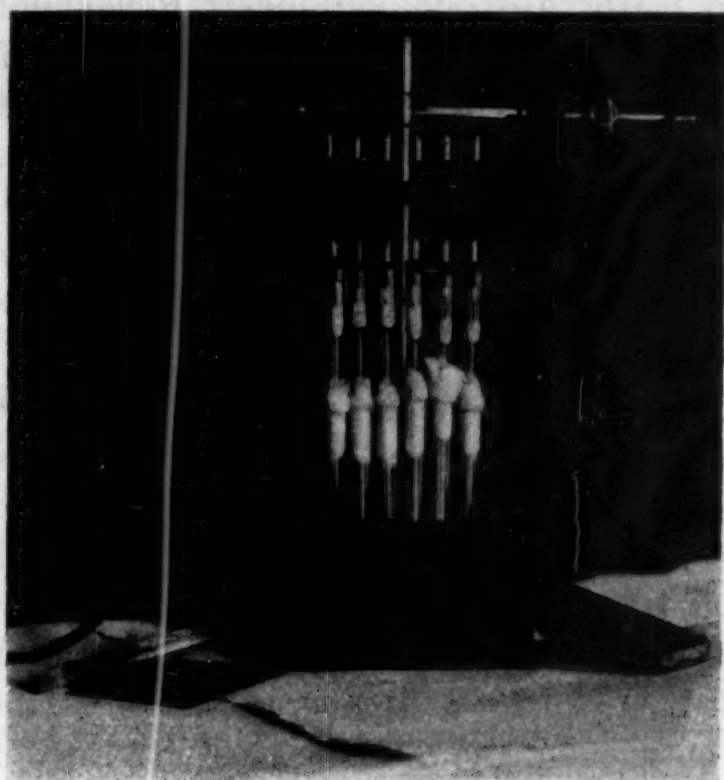


Fig. 1.

vielen darauf senkrechten Löchern, die in der Abbildung schwarz zu sehen sind. Auf letztere wird die photographische Platte mit der Schicht den Röhrchen zugekehrt aufgelegt und durch ein samtbekleidetes Brettchen mit darübergespannter Feder licht-

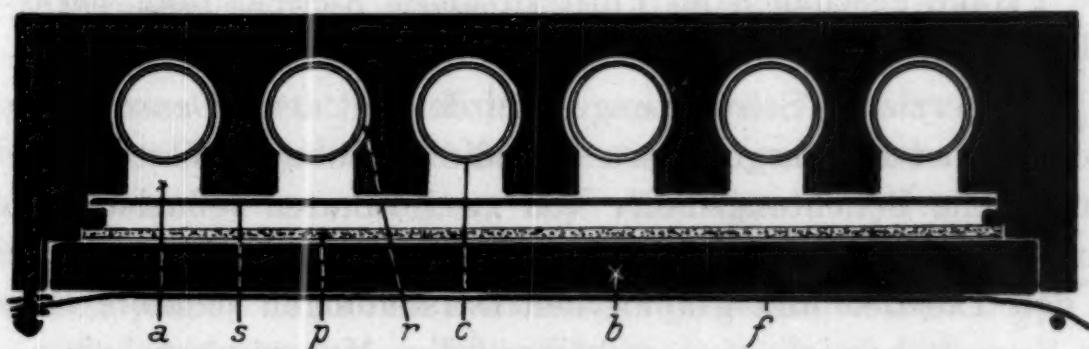


Fig. 2.

dicht verschlossen gehalten. Vor der Platte befindet sich ein Schieber, um vorzeitige Belichtungen hintanzuhalten. Fig. 2 zeigt einen Schnitt durch diesen *Belichtungsblock*, horizontal durch die Mitte der waagrechten Öffnungen geführt. *a* dieser Abbildung stellt den Belichtungskanal (horizontale Bohrung) vor, durch den die in *r* eingestellte Leuchtkultur *c* ihr Licht auf die photogra-

phische Schichte p strahlt, solange der Schieber s herausgezogen ist. Den lichtdichten Verschuß bildet das mit Samt belegte Brettchen b , angedrückt mit der Feder f . Um eine möglichst gleichmäßige Ausstrahlung durch die Belichtungsöffnung a zu erhalten, sind die Wände der Löcher mit Gips weiß gestrichen. Dieser gut streuende und matte Anstrich verhindert Reflexbildungen durch die Wand der Kulturröhrchen, welche zu unregelmäßigen Schwärzungen der Platte führen würden, die wegen der folgenden Schwärzungsmessung vermieden werden müssen. Fig. 9 der Tafel zeigt zwei Kopien solcher von verschieden stark leuchtenden Kulturen belichteten Plattenstreifen. Allerdings sind in der positiven Wiedergabe die feinen Schwärzungsunterschiede zum Teil verlorengegangen.

Für solche Aufnahmen eignen sich nur höchstempfindliche und dabei vollkommen klar arbeitende photographische Platten. Ich verwendete für die Versuche dieser Arbeit ausschließlich die Agfa-„Isochromplatte“ mit 23° Scheiner Empfindlichkeit. Die Belichtungszeiten bewegten sich zwischen zwei und vier Minuten. Die Aufnahmen wurden serienweise gleichzeitig in einer Rodinal-lösung 6 : 100 H_2O von 18° C Temperatur in der Dauer von genau vier Minuten entwickelt. Die Spülung nach der Entwicklung wurde in Wasser mit einem Gehalt von 0.5% Essigsäure während einer Minute vorgenommen. Für jede Serie von Aufnahmen kam ein frisch bereitetes 10%iges Fixierbad mit einem 1%igen Kaliummetabisulfitzusatz zur Verwendung. Sowohl das Einlegen der Platten als auch alle nachfolgenden Operationen der Entwicklung und Fixage geschahen im Finstern unter Ausschaltung jedweder Beleuchtung, um jegliche Nebenlichtwirkung auszuschließen.

Die erzielten Schwärzungen wurden mit dem „Densographen“ nach GOLDBERG⁵ ausgemessen und die erhaltenen Werte auf eine einheitliche Belichtungsdauer von zwei Minuten reduziert, sofern nicht von Haus aus diese Belichtungszeit verwendet worden ist. In den Tabellen und graphischen Darstellungen (letztere einfach als Kurven bezeichnet) erscheinen die Messungsergebnisse als „Leuchtgrade“ verzeichnet. Letztere entsprechen dem zehnfachen Wert der Ablesung bzw. der reduzierten Zahlen. Dadurch konnten die Kurven übersichtlicher und klarer gestaltet werden, ohne die relativen Verhältnisse, auf die es in erster Linie ankommt, zu stören.

⁵ Erzeugt von den Zeiß-Ikon-Werken in Dresden.

Wie schon eingangs erwähnt, fanden für die vorliegenden Untersuchungen ausschließlich „Flüssigkeitskulturen“ Verwendung, um bei der Belichtung der Platten die leuchtenden Zellen gleichmäßig verteilen und genügend mit Luftsauerstoff versehen zu können. Für diese Zwecke stellte ich „Durchlüftungs-Kulturröhren“ zusammen, wie sie im axialen Längsschnitt die Fig. 3 wiedergibt. In eine Kulturröhre aus Jenaer Glas ragt das am Ende auf 1 mm verjüngte, mit einem erweiterten Ansatz versehene Durchlüftungsrohr aus Glas, mit Watte bakteriendicht eingeführt. Der Ansatz selbst enthält ebenfalls einen Wattebausch als Luftfilter. Diese Anordnung wird vor der Füllung mit Nährflüssigkeiten trocken im Heißluftschrank sterilisiert. Es wurde besonders darauf geachtet, gleich weite Kulturröhren zu verwenden und die Rohrspitze ebenfalls immer gleich groß zu haben. Vor der Füllung wird das Einsatzrohr, welches in der Watteführung verschiebbar ist, etwa 5 cm herausgezogen, so daß eine Auslaufspitze $\frac{1}{2}$ cm über dem Flüssigkeitsspiegel nach der Füllung steht. In diesem Zustande wird in der üblichen Weise fraktioniert sterilisiert und dann mit den Leuchtbakterien verimpft.



Fig. 3.

Als *Impfmaterial* diene stets eine Aufschwemmung einer 24stündigen Agarkultur unseres Photobazillus in einer 2%igen Lösung jenes Salzes, das dem Nährboden für die betreffende Versuchsreihe besonders zugesetzt worden war. Für alle Reihen wurde zur Verimpfung dieselbe Platinöse von 3 mm innerem Durchmesser benützt, um dadurch wenigstens bei einer Versuchsreihe in jedes Röhrchen die annähernd gleiche Bakterienmenge zu bringen. Da die Abnahme des Kulturrasens vom Nähragar ebenfalls immer mit der gleichen, jedoch nur 1 mm messenden Platinöse geschah und die Aufschwemmungsflüssigkeit jedesmal 5 cm³ betrug, wurden die quantitativen Impffehler auf das kleinstmögliche Maß heruntergedrückt.

Neben der Feststellung der Leuchtstärke wurde auch versucht, die Vermehrung der eingepfchten Bakterien zahlenmäßig zu verfolgen, was aber große Schwierigkeiten bereitete. Wenn es sich nur um die Feststellung der Keimmenge nach beendetem

Versuch gehandelt hätte, wären die Keimzählmethoden gut verwendbar gewesen. So aber sollte das Wachstum in den einzelnen Kulturen einer Reihe gleichzeitig mit der Lichtstärkemessung bestimmt werden, ohne die Röhrchen zu öffnen und dabei einer Verunreinigung auszusetzen. Deshalb konnten nur *Bestimmungen der Trübung* der einzelnen Kulturen vorgenommen werden, aus deren Zunahme auf die Vermehrung vorsichtige Schlüsse zu ziehen waren. Die Trübungsmessungen wurden mit dem *Zeißschen Trübungsmesser* in Verbindung mit dem *Pulfrich-Photometer*⁶ unmittelbar in den Kulturröhrchen ausgeführt. Dabei ist besonders auf die Einhaltung der stets gleichen Temperatur im Wasserbade des Apparates zu achten, die ich ein für allemal mit 18° C festlegte. Ich verwendete das rote Filter und wechselte nur entsprechend der Stärke der zu messenden Trübung die Vergleichsscheibe, um bei der Ablesung der Meßtrommel möglichst in der Mitte der Skala zu bleiben. Für die Auswertung der Ablesungen wurden die erhaltenen Zahlen auf die Vergleichsscheibe 3 umgerechnet, um vergleichbare Werte zu erhalten. Bei allen Proben wurde zuerst die „Anfangstrübung“ der unverimpften sterilen Nährflüssigkeit bestimmt und von den gemessenen Wachstumstrübungen abgezogen. Obwohl die Röhrchen mit der Nährflüssigkeit dem Auge ursprünglich blank und trübungslos erscheinen, erhält man stets Trübungswerte von verschiedener und für die Berechnung jedenfalls zu berücksichtigender Größe. — Die „*Trübungszahl*“ der Tabellen und Kurven ist auf diese Weise einheitlich errechnet. Es sei nochmals betont, daß auch hier nur die *relativen* Trübungswerte bestimmt wurden.

Bei relativ niedrigem Salzgehalt der Kulturen können die gemessenen Trübungen in den ersten 36—48 Stunden des Wachstums allerdings mit der Größe der Vermehrung in unmittelbare Beziehung gebracht werden, weil sich unter diesen Verhältnissen die Zellen überwiegend frei in der Flüssigkeit befinden und keine Zoogloen und Verklumpungen bilden. Auch ist die Form und Größe der einzelnen Bakterien bzw. die Menge der verschiedenen Wachstumsstadien der Mikroben ziemlich gleichbleibend. Später und besonders auch bei großer Salzkonzentration erscheinen größere Formen und Zusammenlagerungen und Verklebungen von Zellen, die den Wert der Trübungsmessung für die Beurteilung des

⁶ Über Konstruktion der Apparatur und deren sonstige Anwendung vgl. die Druckschriften Mess. 430/II und Mess. 4311 von Zeiß in Jena.

Wachstums schädigen. Physikalisch gesprochen, ist die Ungleichheit der lichtstreuenden, also trübenden Teilchen zu groß geworden, um die Lichtstreuung dieser Teilchen mit jenem der einheitlichen kleinen Teilchen des Versuchsbeginnes vergleichen zu können. Dazu kommen noch die Fehler durch die Mitbestimmung der bereits toten in der Flüssigkeit ebenfalls verteilten Mikrobekörper. Wenn man diese Fehlerquellen genügend berücksichtigt, kann man mit der entsprechenden Vorsicht aus dieser Art der Trübungsmessung Schlüsse auf das Wachstum bzw. auf die Zellvermehrung ziehen.

Zwecks *Messung der Leuchtstärke* einer Serie von sechs Kulturröhrchen wurden dieselben in den mit der photographischen Platte beschickten Belichtungsapparat im Dunkelzimmer eingesetzt und an den an einem Luftgasometer hängenden Luftverteiler angeschlossen, wie es aus Fig. 1 ersichtlich ist. In die Erweiterung der „Durchlüftungsröhren“ kommen durchbohrte Kautschukstopfen mit durchgehendem Glasröhrchen, die durch einen Kautschukschlauch mit den Auslässen des gläsernen Luftvertailers verbunden werden. Die Durchlüftungsröhrchen werden bis 5 mm Abstand vom Boden der Kulturröhren in die Flüssigkeit eingeschoben. Der rechte Hahn des Luftvertailers ist geschlossen, während durch den linken Hahn die vom Gasometer einströmende Luft so reguliert wird, daß in einem Tempo von zirka einer Sekunde die Luftblasen durch die Kultur perlen. Zu rasches Durchströmen von Luft führt zu Schaumbildungen, die dann bis zu den Wattedichtungen aufsteigen und diese benetzen, was streng zu vermeiden ist. Es hat sich als vollkommen ausreichend erwiesen, in Intervallen von 15 Sekunden, je fünf Sekunden Luft durchzuleiten. Dadurch werden die Bakterien in der Nährflüssigkeit einerseits gleichmäßig verteilt und andererseits erhält die Kultur genügend Sauerstoff, um gleichmäßig maximal zu leuchten. Wenn man durch zwei Minuten auf diese Weise die Durchlüftung vorgenommen hat, zieht man den Verschlussschieber von der photographischen Platte weg und belichtet 2—4 Minuten, je nach der Helligkeit des Leuchtens. Auch während der Belichtung schickt man im gleichen Turnus Luft durch die Kulturen.

Schließlich sei noch erwähnt, daß die p_H -Bestimmungen auf kolorimetrischem Wege mit dem Komperator von WALPOLE und den p_H -Reihen ohne Puffer nach MICHAELIS unter Anwendung von *m*- und *p*-Nitrophenol gemacht wurden.

NaCl- und NaBr-Versuchsreihen.

NaCl - V e r s u c h e.

Schon entsprechend der chemischen Zusammensetzung der Flüssigkeiten des natürlichen Standortes der Leuchtbakterien kommt den Verbindungen des *Natriums* im Lebensablauf dieser Organismen große Bedeutung zu. Nach RICHTER⁷ soll es für diese Organismen lebenswichtig sein. Es wurde nun versucht, die günstigste Konzentration des NaCl und NaBr allein und in Verbindung mit Glyzerin als besondere C-Quelle für das Leuchten festzustellen. Die folgende Tabelle 1 ergibt die Zusammensetzung der einzelnen Kulturen und deren Leuchtgrade nach bestimmten Wachstumszeiten.

Tabelle 1.
NaCl-Versuch ohne Glyzerin.

Nummer der Kultur	cm ³				NaCl-Gehalt		p _H		Leuchtgrad nach Stunden		
	Stamm-Bouillon	2-n.-NaCl-Lösung	H ₂ O	Summe	normal	Prozent	Versuchs-anfang	Nach 80 Stunden	37	48	80
1	50	5	45	100	$\frac{1}{10}$	0.59	7.1	7.5	0	0	0
2	50	10	40	100	$\frac{2}{10}$	1.17	7.1	7.5	2.2	7.5	0.6
3	50	15	35	100	$\frac{3}{10}$	1.75	7.1	7.5	8.5	18.0	1.9
4	50	20	30	100	$\frac{4}{10}$	2.34	7.1	7.5	8.8	15.0	3.9
5	50	25	25	100	$\frac{5}{10}$	2.92	7.1	7.5	3.2	9.0	5.4
6	50	30	20	100	$\frac{6}{10}$	3.50	7.1	7.4	2.0	4.5	6.0

Wenn man nach den verschiedenen Zeiten die *Leuchtoptima* betrachtet, findet man dieselben nach 37 Stunden beim Röhrchen 4 mit einem NaCl-Gehalt von $\frac{4}{10}$ normal, nach 48 Stunden bei der Kultur 3 mit $\frac{3}{10}$ n. NaCl, und nach 80 Stunden bei der Probe 6 mit der NaCl-Konzentration $\frac{6}{10}$ normal. Fig. 4 zeigt die mit den Leuchtgraden konstruierten *Kurven*, bei denen die Abszisse die Zeitmarken und die Ordinate die Leuchtgrade trägt. Die den Kurven beigeetzten Zahlen geben das zugeordnete Kultur-röhrchen der Tabelle 1 an, dessen Numerierung mit dem Zehntel-normalgehalt an Salz übereinstimmt.

Die Kurven aller fünf Röhrchen weisen darauf hin, daß in den ersten 48 Stunden ein starker Anstieg der Leuchtfunktion auftritt, während dann der Abfall in den Röhrchen 3, 4 und 5 lang-

⁷ O. RICHTER, Anz. Ak. Wiss. Wien (II b) 1928, S. 163.

samer, aber umgekehrt dem Anstieg erfolgt. Nur die Probe mit größtem NaCl-Gehalt (6) weist auch nach 48 Stunden einen allmählichen, aber stetigen Anstieg auf. Die optimale Salzkonzentration für NaCl ohne Beigabe einer C-Quelle befindet sich demnach zwischen $3/10$ und $4/10$ normal.

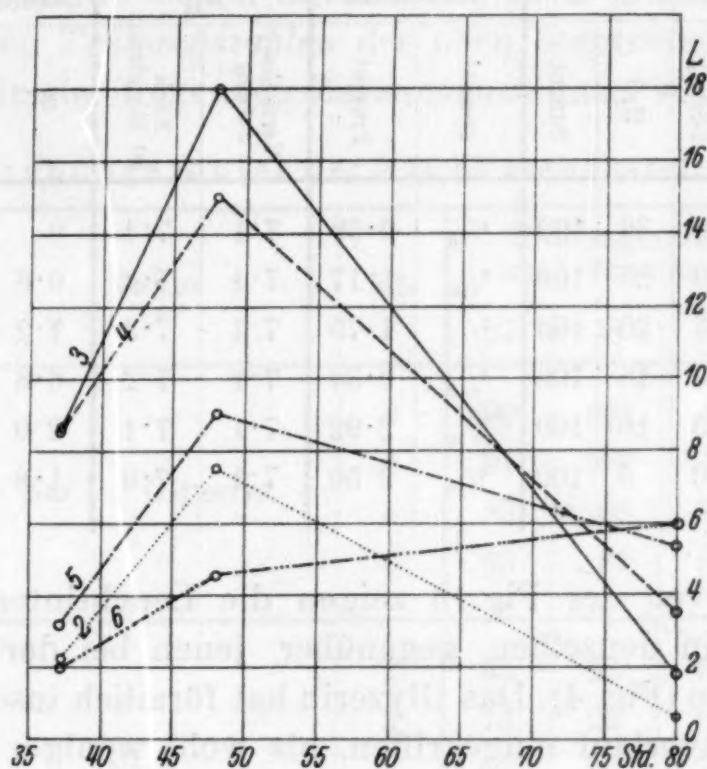


Fig. 4.

Probe 2 nähert sich im Verlauf des Leuchtens der Probe 5, ohne aber die Stärke der Lichtentwicklung der letzteren zu erreichen. Hier ist die Salzkonzentration schon zu niedrig und dadurch auch die geringe Lichtintensität erklärlich.

Die Tabelle 1 zeigt noch, daß die p_H -Werte während des Wachstums im alkalischen Ast zunehmen und nach 80 Stunden in den fünf ersten Proben 7.5 erreichen, während Röhrchen 6 nach dieser Zeit $p_H = 7.4$ besitzt.

Die Zugabe einer besonderen C-Quelle in Form von Glyzerin in der Menge von 0.69% führt nach den gleichen Wachstumszeiten zu einer Annäherung der Leuchtmaxima in den ersten 48 Stunden bei den Proben 3 und 4, wie es aus der Tabelle 2 ersichtlich ist.

Die absoluten Leuchtstärken sind aber durch den Glyzerinzusatz in den Röhren 3 und 4 nicht unbeträchtlich erniedrigt, während dieselben bei höherem NaCl-Gehalt, besonders nach 80 Stunden, erhöht erscheinen. In dem Röhrchen 2 ist die Licht-

bildung wesentlich gedrückt, während gerade dort nach 80 Stunden der höchste p_H -Wert mit 7.4 erreicht worden ist.

Tabelle 2.
NaCl-Versuch mit 0.69% Glycerin.

Nummer der Kultur	cm ³					NaCl-Gehalt		p_H		Leuchtgrad nach Stunden		
	Stamm-Bouillon	1/2-Mol-Glycerinlsg.	2-n.-NaCl-Lösung	H ₂ O	Summe	normal	Prozent	Versuchs-anfang	Nach 80 Stunden	37	48	80
1	50	15	5	30	100	1/10	0.59	7.1	7.4	0	0	0
2	50	15	10	25	100	2/10	1.17	7.1	7.4	0.6	0.8	0
3	50	15	15	20	100	3/10	1.75	7.1	7.3	7.2	14.3	0.6
4	50	15	20	15	100	4/10	2.34	7.1	7.2	6.8	14.2	3.0
5	50	15	25	10	100	5/10	2.92	7.1	7.1	2.0	5.0	8.2
6	50	15	30	5	100	6/10	3.50	7.1	7.0	1.8	2.5	6.0

Die Kurven der Fig. 5 zeigen die Leuchtintensitäten und Unterschiede in denselben gegenüber jenen bei der Zucht ohne Glycerinzugabe (Fig. 4). Das Glycerin hat förmlich insofern regelnd in den Leuchtverlauf eingegriffen, als wohl weniger hohe Werte

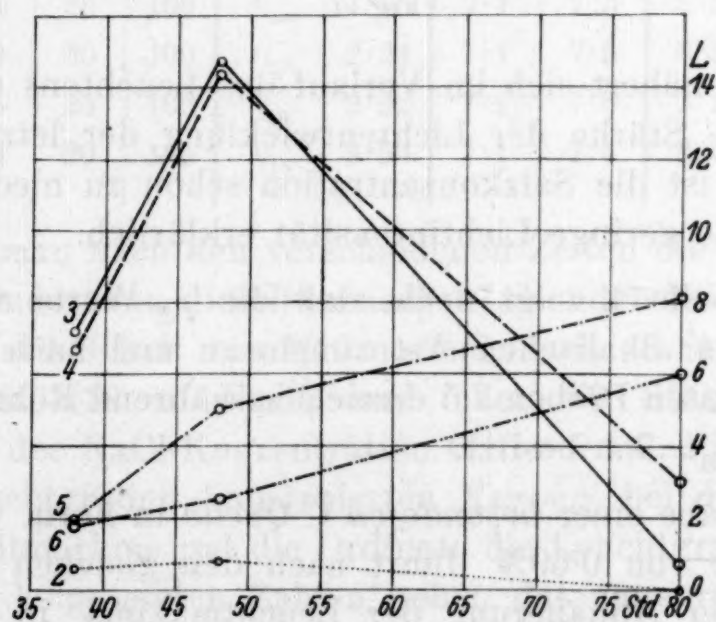


Fig. 5.

erreicht werden, aber dafür der optimale Bereich der NaCl-Konzentrationen weiter gestaltet wird, was besonders die Kurven 3 und 4, entsprechend 3/10 und 4/10 n. NaCl dartun. Es treten dadurch die optimalen Bedingungen noch deutlicher und schärfer hervor, als es sonst ohne Glycerinzusatz der Fall ist.

Wenn man nun die *Vermehrung* der Mikroben mit der Lichtentwicklung derselben in Beziehung zu bringen versucht, so kann man, wie schon früher bemerkt, dazu die nach verschiedenen Wachstumszeiten auftretenden *Trübungen* heranziehen. Man muß sich nur über die Fehlerquellen solcher Trübungsmessungen im klaren sein, auf die schon an anderer Stelle hingewiesen wurde. Die erhaltenen *Trübungszahlen* der oben besprochenen Versuchsreihen sind in der folgenden Zusammenstellung wiedergegeben.

Trübungszahlen der NaCl-Versuchsreihen.

Kultur	Nr.	Trübungszahl nach Stunden		
		37	48	80
NaCl + Glyzerin	3	90	100	47
	4	91	102	49
	5	83	86	86
	6	65	81	89
NaCl	2	35	52	62
	3	73	95	67
	4	67	90	72
	5	72	67	60
	6	55	64	50

Man ersieht daraus, daß bei den NaCl-Reihen mit und ohne Glyzerinzusatz im allgemeinen die Höchstwerte der Trübungen wieder bei den optimalen Salzkonzentrationen zu finden sind, was besonders für die ersten Vermehrungszeiten gilt. Hier darf man auch füglich aus dem Trübungsgrad auf die Größe der Vermehrung schließen und annehmen, daß *die für das Leuchten beste Salzkonzentration auch das Wachstum am meisten fördert*.

Verfertigt man mit den Trübungszahlen der einzelnen Proben als Ordinatenmarken Kurven, wie sie in Fig. 6 für Kulturen *mit* Glyzerin und Fig. 7 für solche *ohne* diesen Zusatz wiedergegeben sind, während die Abszissen die Zeitmarken tragen, so kann man das Wachstum auch mit den Leuchteffekten in unmittelbaren Zusammenhang bringen. Zu dem Ende ist in jede dieser beiden Figuren noch eine Kurvenschar eingezeichnet, deren Abszisse die Leuchtgrade der Tabellen 1 und 2 trägt. Es ist dies durch die Buchstaben *T* (Trübungszahl) links und *L* (Leuchtgrade) rechts

angedeutet, während die Zeitmarken für beide Kurvenscharen übereinstimmen. Zur leichteren Unterscheidung sind die Trübungskurven dick gezogen, während die Leuchtkurven dünn gezeichnet wurden.

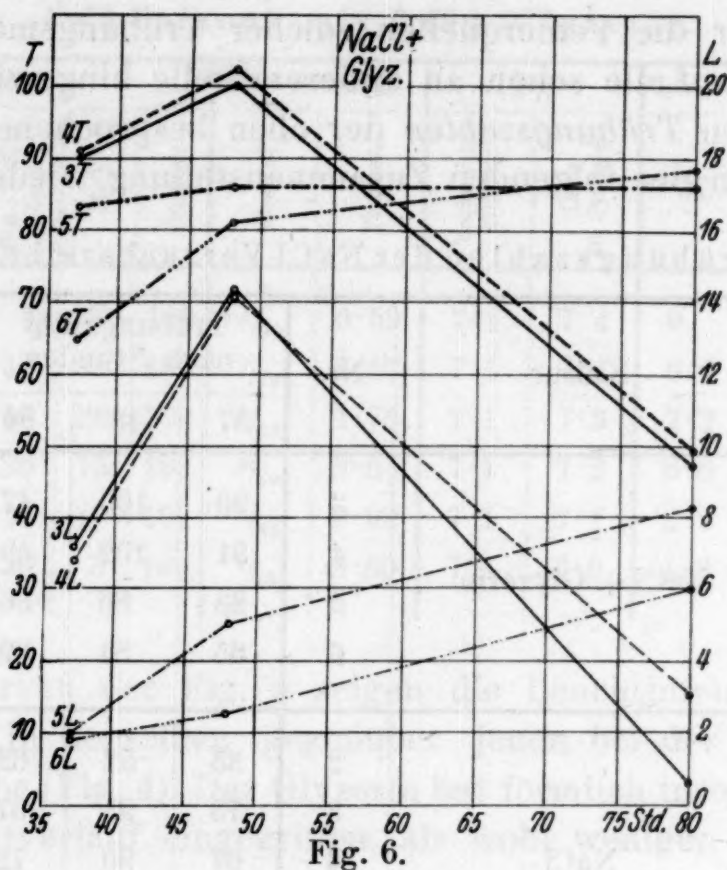


Fig. 6.

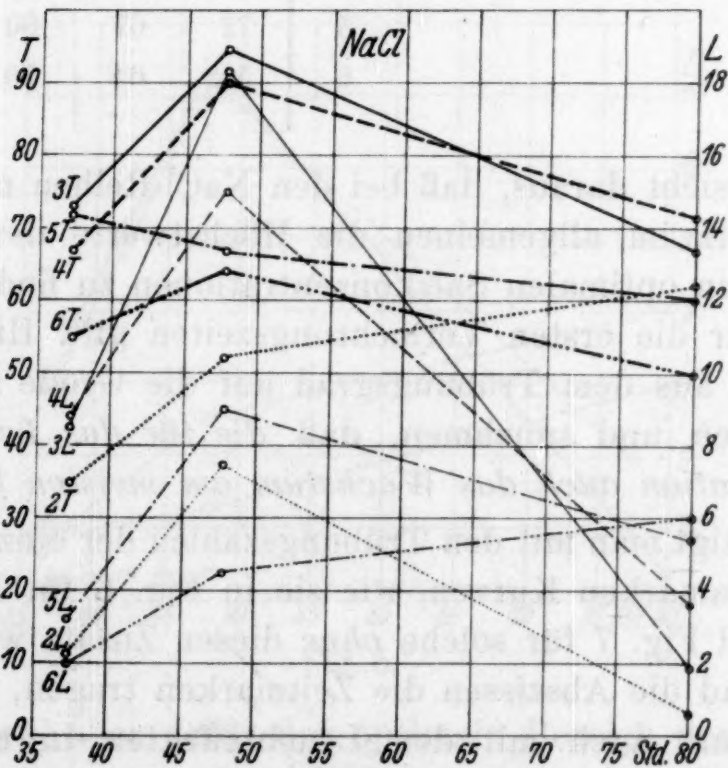


Fig. 7.

Betrachten wir den Verlauf der Kurven 3 L und 3 T in der Fig. 6, so finden wir eine gute Übereinstimmung im Wachstum und Leuchten, was auch für die Kurven 4 L und 4 T ohneweiters

gilt. Bei 5 und 6, also den Röhrchen mit hohen Salzkonzentrationen, schreitet nach 48 Stunden das Leuchten anscheinend rascher fort als die Vermehrung. Man darf aber nicht vergessen, daß die erhöhten NaCl-Gehalte zu einer deutlichen Verklebung von Zellen führen, wodurch der früher erwähnte Fehler der Trübungszahlen in den Vordergrund tritt.

Vergleicht man damit die Verhältnisse beim Wachstum und Leuchten *ohne* Glyzerinzusatz, wie sie die Kurven der Fig. 7 darstellen, so findet man hier noch weitgehendere Unstimmigkeiten, wenn auch die Optima bei 3 und 4 in bezug auf Trübung und Vermehrung zusammenfallen. Bei 5 und 6 tritt die Salzwirkung ganz besonders insofern in den Vordergrund, als im ersteren Falle (5 T) die höchste Trübung nach 37 Stunden zu erhalten ist und von da ab ständig fällt, während sich optimales Leuchten nach 48 Stunden trotz verringerter Trübung einstellt, um weiterhin allmählich zu fallen. Bei 6 scheint allerdings eine Übereinstimmung zwischen Wachstum und Lichtbildung bis 48 Stunden zu bestehen; dann aber verringert sich die Trübung, obwohl das Leuchten noch ansteigt. Für die Zeit nach 48 Stunden zeigt die Probe 2 gerade das Umgekehrte, indem bei abnehmendem Leuchten die Trübung zunimmt (2 L und 2 T der Fig. 7). Die hier herrschende niedrige Salzkonzentration vermag keine besondere Lichterzeugung zu unterhalten, gestattet aber eine gleichmäßige Vermehrung der Mikroben ohne stärkere Zusammenballung derselben.

NaBr - V e r s u c h e.

Unter den gleichen Nähr- und Züchtungsbedingungen wurden Versuchsreihen angelegt, in denen das Chlornatrium durch NaBr vertreten war, indem an Stelle des Kochsalzes äquimolare Mengen des Bromides zugesetzt wurden. Wieder enthielten die sechs Proben steigende Mengen NaBr, entsprechend 1/10 bis 6/10 n. NaBr. Somit herrschten in diesen Bromidreihen die gleichen osmotischen Verhältnisse wie bei den früher besprochenen Chloridversuchen.

Aus der Tabelle 3 ist die Zusammensetzung der einzelnen Proben ohne Glyzerin und die durch sie erzeugten Leuchtstärken zu entnehmen. Wie man auch ersieht, ist der prozentuelle Salzgehalt in den einzelnen Röhrchen fast doppelt so groß wie in der Chloridreihe, weil eben das NaBr ein viel größeres Molekulargewicht besitzt als NaCl.

Tabelle 3.
NaBr-Versuch ohne Glyzerin.

Nummer der Kultur	cm ³				NaBr-Gehalt		p _H		Leuchtgrad nach Stunden		
	Stamm-Bouillon	2-n.-NaBr-Lösung	H ₂ O	Summe	normal	Prozent	Versuchs-anfang	Nach 63 Stunden	22	46	63
1	50	5	45	100	$\frac{1}{10}$	1.03	7.0	7.0	0	0	0
2	50	10	40	100	$\frac{2}{10}$	2.06	7.0	7.5	0	0	0
3	50	15	35	100	$\frac{3}{10}$	3.09	7.0	7.5	6.0	8.0	9.0
4	50	20	30	100	$\frac{4}{10}$	4.12	7.0	7.5	11.0	14.6	13.2
5	50	25	25	100	$\frac{5}{10}$	5.15	7.0	7.5	8.2	16.0	15.8
6	50	30	20	100	$\frac{6}{10}$	6.18	7.0	7.5	6.6	14.0	14.5

Die Leuchtoptima liegen bei einer NaBr-Konzentration von 4/10 bis 5/10 n., sind also gegenüber jenen bei Kochsalzzusatz *gegen die höheren Konzentrationen zu verschoben*. Auch hier besteht das Bestreben, beim Wachstum die Alkaleszenz des Nährbodens zu erhöhen, denn die ursprünglichen p_H-Werte (7) der Proben sind auf p_H = 7.5 gestiegen, sofern Wachstum eingetreten ist. Nr. 1 dieser Reihe zeigte weder eine Entwicklung noch eine Lichtproduktion, während 2 zwar Wachstum, jedoch kein Leuchten aufwies. Um beides zu ermöglichen, ist eine Mindestkonzentration von über 2/10 n. NaBr notwendig.

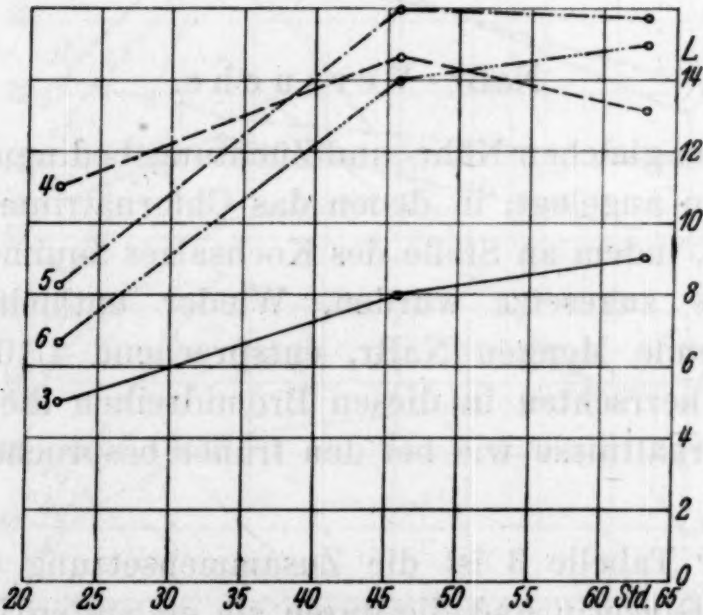


Fig. 8.

Fertigt man mit den Leuchtgraden auf der Ordinate und den Zeitmarken auf der Abszisse die *Leuchtkurven* dieser Proben an, wie es in Fig. 8 geschehen ist, so zeigen die Röhrchen 4, 5 und 6

nach 46 Stunden einen raschen Anstieg des Leuchtvermögens. In der Probe 3 ist die Leuchtkraft überhaupt geringer, die Lichtzunahme langsamer, und über 46 Stunden hinaus fast gleich zunehmend wie in den ersten Wachstumszeiten. Auch im Leuchten der Probe 6 tritt innerhalb der Beobachtungszeit keine Abnahme auf. Es verhält sich hier in bezug auf den Anstieg wie im Röhrchen 3. Bei den Kulturen 4 und 5 ist der Wendepunkt nach 46stündiger Entwicklung deutlich. Jedenfalls weichen die Leuchtkurven bei Verwendung von NaBr sehr auffallend von jenen mit NaCl ab (vgl. Fig. 4), wenn auch keine so großen Leuchtwerte erreicht werden. Weiters ist die Erscheinung beachtenswert, daß *Photobacillus radians* *weit größere Mengen von NaBr im Nährboden durch lange Zeit verträgt* als solche von NaCl. Ebenso bemerkenswert ist die verhältnismäßig starke Alkalibildung in den NaBr-Kulturen (von $p_H = 7$, auf $p_H = 7.5$).

Wesentlich anders gestalten sich die Leuchtverhältnisse bei der Zucht mit NaBr-Zusätzen und *Glyzeringaben*, wie die folgende Tabelle 4 dartut, in der die Zusammensetzung der Nährlösungen in einer Versuchsreihe mit NaBr und Glyzerin und deren Leuchtergebnisse zusammengefaßt sind.

Tabelle 4.

NaBr-Versuch mit Glyzerin.

Nummer der Kultur	cm ³					NaBr-Gehalt		p_H		Leuchtgrad nach Stunden		
	Stamm-Bouillon	1/2-Mol.-Glyzerinlsg.	2-n.-NaBr-Lösung	H ₂ O	Summe	normal	Prozent	Versuchs-anfang	Nach 63 Stunden	22	46	63
1	50	15	5	30	100	1/10	1.03	7.0	7.0	0	0	0
2	50	15	10	25	100	2/10	2.06	7.0	7.3	1.4	7.7	1.0
3	50	15	15	20	100	3/10	3.09	7.0	7.3	6.4	17.0	4.0
4	50	15	20	15	100	4/10	4.12	7.0	7.3	7.0	19.4	9.5
5	50	15	25	10	100	5/10	5.15	7.0	7.3	6.0	19.0	15.5
6	50	15	30	5	100	6/10	6.18	7.0	7.3	5.8	20.0	13.0

Vor allem leuchtet auch die Probe 2 mit 2/10 n. NaBr. Dann sind die *Leuchtmaxima* nach 46 Stunden in den Röhrchen 4 bis 6 kaum nennenswert verschieden, aber alle zeigen scharfe Umkehrpunkte bei 46 Stunden. Von dieser Zeit ab tritt ein dem Aufstieg fast gleicher Abfall der Leuchtfunktion ein. Bei der passendsten NaBr-Konzentration nähert sich im Falle der Glyzerinzugabe der

Verlauf sehr jenem bei den NaCl-Versuchen mit Glyzerin. Es zeigt sich aber die Glyzerinwirkung bei Verwendung des Bromsalzes weitaus prägnanter. Die Fig. 9 zeigt die Leuchtkurven dieser Ver-

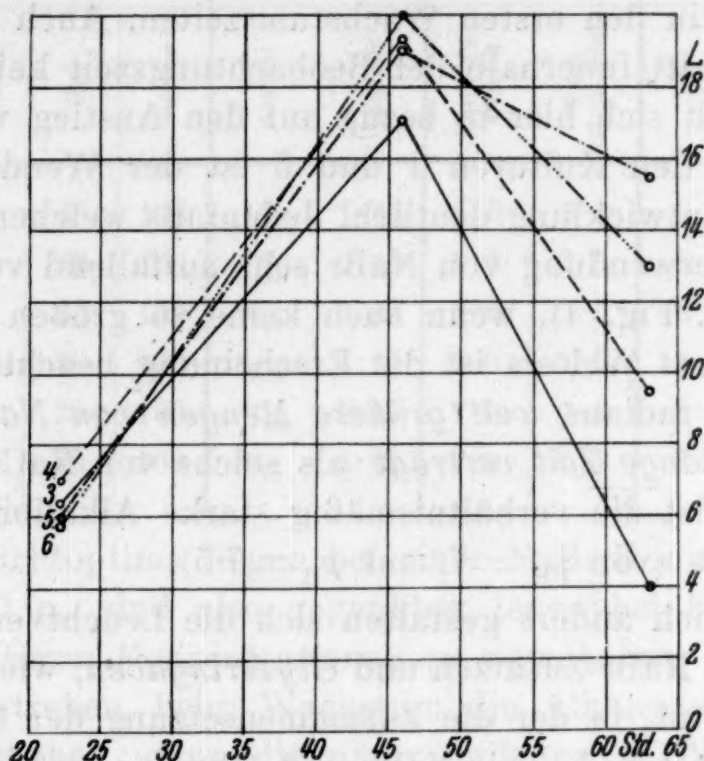


Fig. 9.

suchsreihe nach den Leuchtgraden der Tabelle 4. Hier treten die geschilderten abweichenden Verhältnisse noch krasser hervor. Die Lichtstärke ist ebenfalls durch den Glyzerinzusatz sehr bedeutend erhöht (NaBr + Glyzerin maximal = 20, gegenüber NaBr ohne Glyzerin = 16).

Soweit *Trübungsmessungen* einigermaßen Schlüsse zulassen, kann allgemein gesagt werden, daß die Vermehrung trotz sehr guten Leuchtens bei den optimalen Salzbedingungen als geringer einzuschätzen ist als bei den NaCl-Versuchen, einerlei ob mit oder ohne Glyzerin.

Trübungszahlen der NaBr-Versuchsreihen.

Kultur	Nr.	Trübungszahl nach Stunden			Kultur	Nr.	Trübungszahl nach Stunden		
		22	46	63			22	46	63
NaBr + Glyzerin	2	13·0	33·0	39·0	NaBr	2	5·7	16·2	29·2
	3	15·0	53·0	47·0		3	13·5	46·0	51·0
	4	16·5	53·2	61·2		4	12·5	40·5	49·5
	5	19·5	49·5	72·0		5	12·3	36·8	46·8
	6	19·1	45·6	71·6		6	11·5	27·0	38·0

Die Zusammenstellung der *Trübungszahlen* der NaBr-Versuchsreihen läßt weiter erkennen, daß die Vermehrung im allgemeinen durch den Glyzerinzusatz etwas erhöht wird.

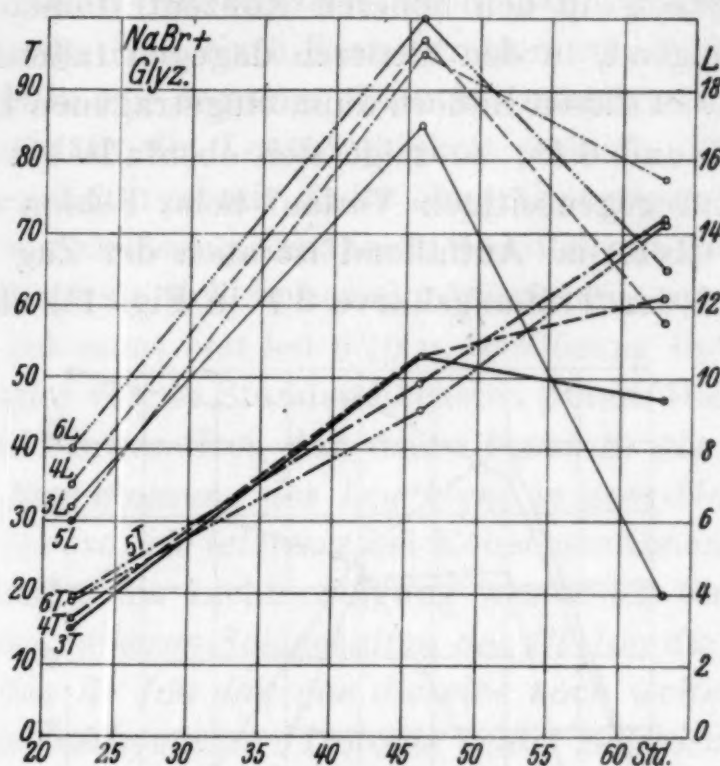


Fig. 10.

Die Natriumbromidzugaben scheinen überhaupt die Neigung der Zellen zu Verklebungen zu steigern, was die niedrigen Trübungszahlen auch bei guter Lichtentwicklung verständlich macht.

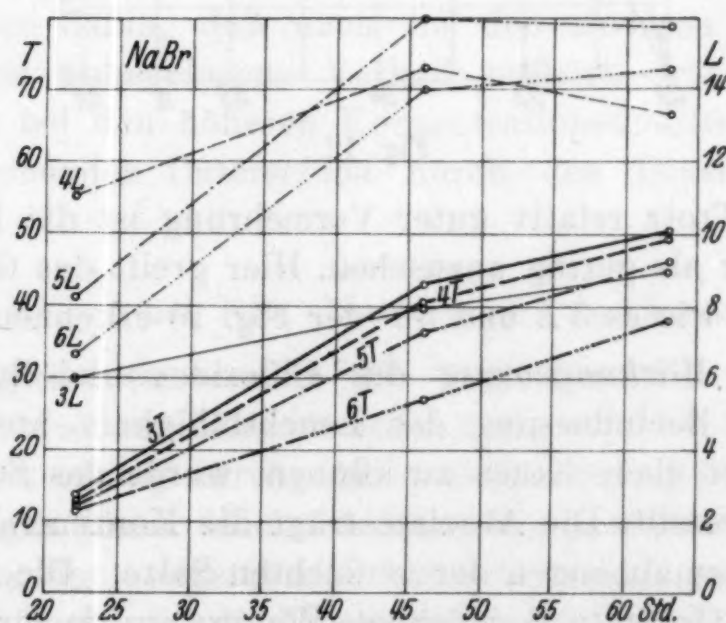


Fig. 11.

Wenn man die Trübungszahlen der einzelnen Proben graphisch auswertet, erhält man die in den Fig. 10 und 11 wiedergegebenen *Trübungsverlaufslinien*. Sowohl bei Glyzerinzugabe

(Fig. 10) als auch ohne eine solche (Fig. 11) sind die Kurvenscharen geschlossen und bis zur Wachstumszeit von 46 Stunden ansteigend; von da ab bei Glyzerinmangel weiter steigend und bei Glyzeringaben in den höheren Konzentrationen mehr oder weniger ansteigend, in den niederen dagegen fallend. Vergleicht man damit die in diesen Bildern dünn eingetragenen Leuchtkurven (3 L, 4 L, 5 L und 6 L), so zeigt sich ebenfalls ein wesentlicher Unterschied im gegenseitigen Verlauf beim Fehlen und Vorhandensein von Glyzerin. Auffallend ist auch der Zug der Leuchtkurve 3 L und der Trübungskurve 3 T in Fig. 11, also ohne Gly-

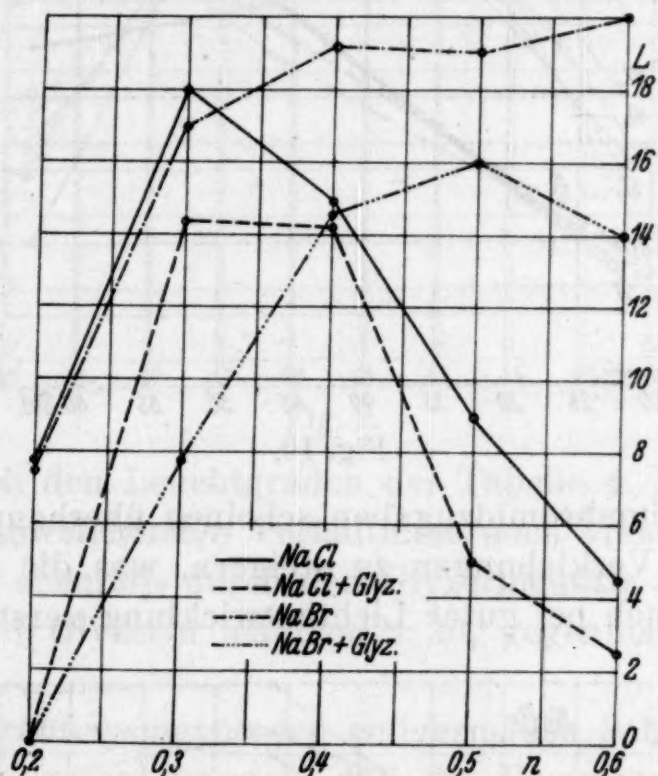


Fig. 12.

zerinzusatz. Trotz relativ guter Vermehrung ist die Leuchtfähigkeit doch nur als gering anzusehen. Hier greift das Glyzerin verbessernd ein, wie es 3 L und 3 T der Fig. 10 erkennen lassen.

Um die *Wirkungsweise* des Chlorides und Bromides hinsichtlich der Beeinflussung der Leuchtfähigkeit unseres Photobazillus besser überschauen zu können, wurde das Schaubild der Fig. 12 hergestellt. Die Abszisse trägt die Konzentrationsmarken in Zehntel-Normalmengen der versuchten Salze. Die Leuchtgrade sind auf der Ordinate verzeichnet. Weiters wurde für diese Übersicht die Wachstumszeit von 46 bzw. 48 Stunden gewählt und die dieser Zeit entsprechenden Leuchtgrade herausgehoben. Es bauen sich somit diese Kurven auf den Leuchtgrad nach 46 bzw. 48 Stunden jeder der vier Salzkombinationen, NaCl allein, NaCl mit Gly-

zerin, NaBr allein und NaBr mit Glyzerin, in den auf der Abszisse angesetzten Konzentrationen auf.

Verfolgt man den Leuchtverlauf bei verschiedenem NaCl-Gehalt ohne Zusatz von Glyzerin, sieht man das Leuchtmaximum im Röhrchen mit einer NaCl-Konzentration von 3/10 n. auftreten. Es ist jedenfalls eng begrenzt, denn bei niedrigerer oder höherer Konzentration fällt die Leuchtfähigkeit steil ab. Vergleicht man damit die Leuchtkurve mit NaBr ohne Glyzerinzugabe, verläuft sie bis 3/10 n. Salzlösung annähernd parallel mit der NaCl-Linie. Dann aber erhebt sie sich weiter allmählich ohne ausgesprochenen Abstieg und bekommt erst bei 6/10 n. Salzlösung ihren in der Beobachtungsdauer von 48 Stunden höchsten Stand. Dieser Vergleich zeigt klar und einwandfrei, daß dem *Cl* und *Br* als Anionen eine weitgehende Beeinflussung des Leuchtens in dem Sinne zukommt, daß *ersteres ebenso wie letzteres* bei Konzentrationen von 2/10 bis 3/10 n. Salzlösung die Lichterzeugung wesentlich fördert, *von da ab aber bei den höheren Salzgehalten das Cl'-Ion die Leuchtfähigkeit hemmt, das Br'-Ion dagegen dieselbe noch weiter günstig beeinflusst.* Trotz vollkommener Isotonie beider Salzlösungen können sich diese Salze doch nicht vollwertig vertreten, denn sonst müßten beide Kurven entweder zusammenfallen oder mindestens parallel knapp nebeneinander verlaufen, wie es annähernd bei den niederen Konzentrationen der Fall zu sein scheint.

Führt man Glyzerin zu, so ändert sich das Bild des Verlaufes dieser Kurven dahin, daß auch bei den niederen Gehalten der parallele und nahegelegene Verlauf aufhört, während die Erscheinungen bei den höheren Konzentrationen 4/10 und 6/10 n. keinen tiefgehenden Unterschied durch den Glyzerinzusatz erfahren.

KCl- und KBr-Versuchsreihen.

Im allgemeinen wurden die Versuchsreihen mit KCl und KBr, in verschiedenen Konzentrationen angewendet, den Natriumversuchsreihen analog durchgeführt. Deshalb ging ich wieder von Normallösungen dieser beiden Salze aus und wählte jenen Gehalt an denselben, der steigend 1/10 bis 6/10 normal umfaßte. Dementsprechend deckt sich die Numerierung der Proben der einzelnen Versuchsreihen mit ihrem Salzgehalt an Zehntelnormal. So wurde in allen gleich bezifferten Kulturen die Isotonie der Nährlösungen gewahrt und die Vergleichsmöglichkeit für alle Proben geschaffen. Es schien auch wünschenswert, in die gegenseitige Vertretbarkeit

von K und Na in bezug auf Leuchten und Wachstum dieser Bakterienart Einblicke zu erhalten, zumal in dieser Hinsicht messende Untersuchungen für Leuchtbakterien mir nicht bekannt wurden. BEIJERINCK⁸ spricht zwar von einer Vertretbarkeit des Kochsalzes durch andere Salze, sofern diese in isotonischen Mengen angewendet werden, welcher Ansicht sich auch MOLISCH⁹ anschloß; jedoch wurden prozentuelle Vergleichslösungen zu den Versuchen verwendet und die Leuchtstärken nicht vergleichend gemessen.

Ohne auf Einzelheiten dieser und anderer älterer Literaturangaben einzugehen, hielt ich eine Überprüfung der Befunde, welche die Basis der genannten Ansichten abgeben, durch Meßversuche in tatsächlich isotonischen Nährmedien für notwendig.

Es sei gleich betont, daß die folgenden Versuche insofern als „unrein“ zu bezeichnen sind, als eine völlige Ausschaltung des Natriums aus denselben nicht geschehen ist. Schon das *Seefischfleischwasser* enthält beträchtliche Mengen Natrium, denn die Aschenanalyse¹⁰ des Fleisches vom *Schellfisch* (*Gadus aeglefinus*) ergibt einen Gehalt von 13·84% Kali und 36·51% *Natron* neben 3·39% Kalk und 1·9% Magnesia. Ein großer Teil der Natriumverbindungen des Fleisches geht aber in die Brühe über. Diese Verbindungen sind in den vorliegenden Versuchen nicht ausgeschaltet und stören die Reinheit derselben. Allerdings kann man das gleiche in bezug auf Kaliumverbindungen für die Natriumversuche des vorigen Abschnittes aussagen. Im Anschluß an die früher erwähnten laufenden Untersuchungen über die Gewinnung der für die Ernährung dieser Mikroben notwendigen chemisch reinen N-Verbindungen werden Versuche mit ausschließlichen Na- bzw. Kalium-Gehalten ausgeführt, deren Ergebnis einer späteren Mitteilung vorbehalten ist. Entsprechende Vorversuche haben gezeigt, daß sich dadurch im wesentlichen nichts ändert.

KCl - V e r s u c h e.

Die Zusammensetzung der Nährflüssigkeiten, die nach bestimmten Wachstumszeiten erhaltenen Leuchtwerte und die Anfangs- und Endreaktion der Versuchsreihe mit KCl *ohne* Glyzerinzugabe sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

⁸ M. W. BEIJERINCK, *Le photobacterium luminosum*, bactérie lumineuse de la mer du nord. Arch. Néerlandaises des Scienc. Exact. et Natur., Haarlem, T. XXIII, 1889.

⁹ H. MOLISCH, *Leuchtende Pflanzen*, 2. Auflage, Fischer, Jena 1912.

¹⁰ Vgl. J. KÖNIG, *Die menschlichen Nahrungs- und Genußmittel* 2. 1904, S. 483.

Tabelle 5.
KCl-Versuch ohne Glyzerin.

Nummer der Kultur	cm ³				KCl-Gehalt		p _H		Leuchtgrade nach Stunden			
	Stamm- Bouillon	2-n.-KCl- Lösung	H ₂ O	Summe	normal	Prozent	Versuchs- anfang	Nach 60 Stunden	24	36	48	60
1	50	5	45	100	1/10	0.75	7.1	7.2	0	0	0	0
2	50	10	40	100	2/10	1.49	7.1	7.3	0	0	4.0	4.8
3	50	15	35	100	3/10	2.24	7.1	7.4	0	2.5	3.5	4.0
4	50	20	30	100	4/10	2.98	7.1	7.4	2.6	4.0	7.5	7.0
5	50	25	25	100	5/10	3.73	7.1	7.4	6.3	4.7	5.0	6.8
6	50	30	20	100	6/10	4.47	7.1	7.4	0.2	8.5	7.4	8.8

In derselben sind die maximalen Leuchtgrade für jeden Beobachtungsabschnitt fett hervorgehoben. Vor allem sind die niederen Werte derselben auffallend. Die höheren Konzentrationen an KCl fördern den Leuchtprozeß noch am meisten. Das Optimum des Salzgehaltes liegt hier um 6/10 n. KCl. Die geringeren Salz-mengen von 2/10 bis 3/10 n. KCl wirken anscheinend überhaupt nur schwach. Auch in dieser Versuchsreihe nimmt beim Wachstum die Alkaleszenz des Nährbodens zu, wie aus der Abnahme der ursprünglichen Wasserstoffionenzahl entsprechend $p_H = 7.1$ auf $p_H = 7.4$ zu ersehen ist.

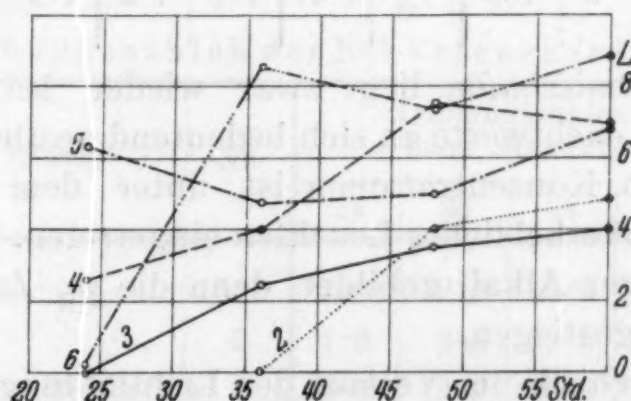


Fig. 13.

Das mit den Leuchtgraden ausgeführte Schaubild der Licht-entwicklung mit KCl ist in Fig. 13 wiedergegeben. Das Leucht-vermögen der Kulturen 2 und 3, entsprechend der Konzentration 2/10 und 3/10 n. KCl steigt allmählich an, ohne in der Beobach-tungszeit von 60 Stunden höhere Werte zu erhalten. Eine ähnliche Zunahme zeigt auch die Probe 4, bei der aber nach 48 Stunden bereits der Abfall einsetzt. Die Probe 6 mit dem höchsten Gehalt an KCl bietet für das Leuchten die optimalen Bedingungen, da

ein rascher Anstieg erfolgte, den ein geringer Abfall ablöste, um einem zweiten Anstieg zu weichen, der das Leuchtmaximum erreichte. Nicht ohneweiters klar sind die im Zuge der Leuchtlinie 5 und 6 eingestreuten Senkungen. Auf dieselben wird bei der Betrachtung der Trübungskurven zurückgekommen. Die eingetragenen Anfangsleuchtgrade der Proben 2 bis 4 zeigen deutlich die Steigerung der lichtfördernden Eigenschaften zunehmender Salzkonzentration.

Durch die Zugabe von 0.69% Glyzerin bei gleichem KCl-Gehalt treten wesentliche Änderungen im Leuchtvermögen auf, wie es die folgende Tabelle 6 zeigt.

Tabelle 6.
KCl-Versuch mit 0.69% Glyzerin.

Nummer der Kultur	cm ³					KCl-Gehalt		p _H		Leuchtgrade nach Stunden			
	Stamm- Bouillon	1/2-Mol- Glyzerinlg.	2-n.-KCl- Lösung	H ₂ O	Summe	normal	Prozent	Versuchs- anfang	Nach 60 Stunden	24	36	48	60
1	50	15	5	30	100	1/10	0.75	7.1	7.1	0	0	0	0
2	50	15	10	25	100	2/10	1.49	7.1	7.2	0	2.0	6.3	7.7
3	50	15	15	20	100	3/10	2.24	7.1	7.2	0	3.0	7.5	8.5
4	50	15	20	15	100	4/10	2.98	7.1	7.2	3.7	4.6	10.5	10.0
5	50	15	25	10	100	5/10	3.73	7.1	7.2	4.8	7.7	18.0	12.4
6	50	15	30	5	100	6/10	4.47	7.1	7.2	1.9	9.3	18.3	12.4

Das *Leuchtmaximum* liegt zwar wieder bei 6/10 n. KCl, jedoch sind die Leuchtwerte an sich bedeutend gestiegen und selbst bei den niederen Konzentrationen ist unter dem Einflusse des Glyzerins nicht unerhebliches Leuchten eingetreten. Es wurde auch wesentlich weniger Alkali gebildet, denn die p_H-Zahlen sind von 7.1 nur auf 7.2 gestiegen.

Die Unterschiede im Verlauf der Lichtbildung mit und ohne Glyzerinbeigabe zeigen sich besonders in der graphischen Auswertung der Leuchtgrade, wie sie die Fig. 14 darstellt. Der Verlauf der Leuchtkurven ist eindeutig und klar und frei von eingestreuten Senkungen und erinnert hinsichtlich der Röhrchen 5 und 6 an den Zug der NaCl-Kurven 3 und 4 der Fig. 5. *Dieser Vergleich allein zeigt überzeugend, daß die Isotonie nicht das wirksame Agens sein kann.* Wäre sie es, müßten die Leuchtkurven der KCl-Proben 3 und 4 mit jenen der NaCl-Röhrchen 3 und 4 parallel laufen oder sich decken, was aber nicht der Fall ist. Das Kation

K⁺ wirkt erst bei weit höherer Konzentration ungefähr ebenso wie das Kation Na⁺. Es gestaltet die Glyzerinzugabe auch in diesem Falle die Entwicklung und das Leuchten stetiger in seinem Verlauf und verhindert das Auftreten von eingestreuten Senkungen.

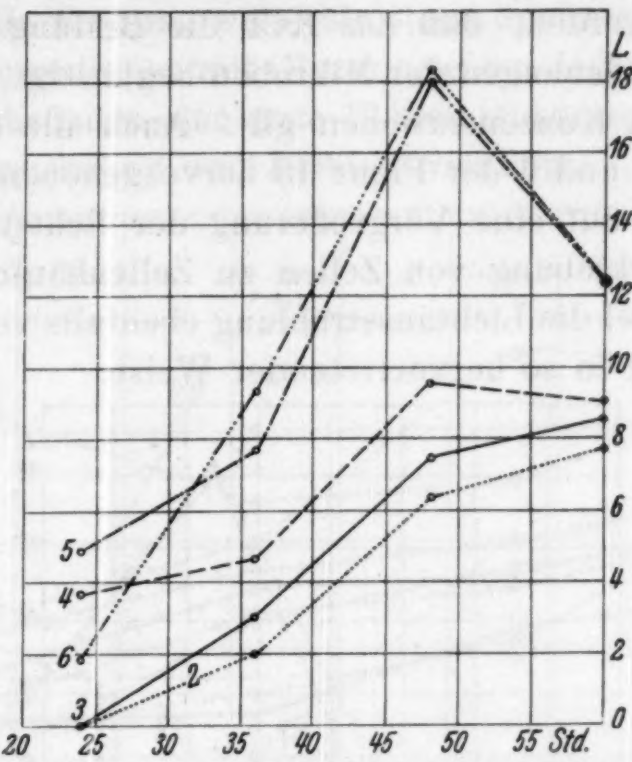


Fig. 14.

Die auf die Vermehrung bezogenen *Trübungszahlen* sind im allgemeinen niedrig, wie aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich ist. Auch Glyzerinzusätze erhöhen dieselben nur unwesentlich.

Trübungszahlen der KCl-Versuchsreihen.

Kultur	Nr.	Trübungszahlen nach Stunden			
		24	36	48	60
KCl + Glyzerin	2	1·0	2·5	13·0	13·5
	3	1·0	3·5	11·5	15·5
	4	8·7	13·0	22·5	25·4
	5	8·6	16·5	21·0	27·0
	6	5·0	14·5	15·5	25·0
KCl	2	2·8	5·6	10·5	24·0
	3	3·0	4·0	12·0	15·0
	4	8·0	15·5	17·0	22·0
	5	11·4	17·3	19·8	24·3
	6	5·4	13·4	15·9	20·9

Nach der *Trübung* beurteilt, wäre das *Vermehrungsoptimum* mit und ohne Glyzerinzusatz bei der Konzentration des Röhrchens 5 anzunehmen, also bei $1/2$ n. KCl, während wir das Leuchtoptimum bei $6/10$ n. KCl feststellen konnten. Es muß jedoch dazu bemerkt werden, daß das KCl die Bildung größerer Zellformen und Verklebungen der Mikroben begünstigt, was besonders für die höheren Konzentrationen gilt. Auch die früher bei den Leuchtkurven 5 und 6 der Figur 13 hervorgehobenen eingefügten Abfälle dürften auf eine Vergrößerung der lichtstreuenden Teilchen durch Verklebung von Zellen zu Zellenhäufchen zurückzuführen sein, wobei die Lichtausstrahlung ebenfalls vermindert wird, wenn auch nicht in so hervortretender Weise.

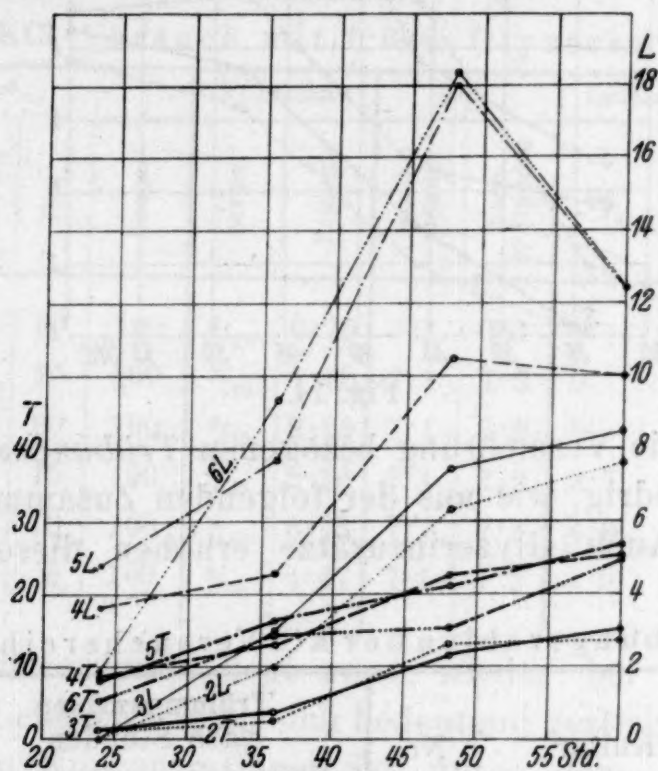


Fig. 15.

Aus den Kurvenscharen der Figuren 15 (mit Glyzerin) und 16 (ohne Glyzerin) ersieht man mit größter Deutlichkeit die Regelmäßigkeit des Trübungsverlaufes während des Wachstums (Kurven $2T$, $3T$, $4T$, $5T$ und $6T$). Die dünn gezeichneten Leuchtkurven zeigen bei den höheren Konzentrationen der Reihe ohne Glyzerin gar keinen Zusammenhang mit den dazugehörigen Trübungskurven, wie es ganz besonders $5L$ und $5T$ und auch $6L$ und $6T$ der Fig. 16 dartun. Im ersteren Fall findet im Zeitintervall 23 bis 27 Stunden ein Anstieg der Trübung (T) statt, während gleichzeitig das Leuchtvermögen zurückgeht. Es hat fast den Anschein, als läge eine Störung des üblichen Zusammengehens von Wachstum und Leuchten vor. Durch die Darreichung von Glyzerin werden diese Diskrepanzen größtenteils vermieden, wie es aus den Kurven

der Fig. 15 hervorgeht. Die Leuchtkurven 5 L und 6 L steigen in den ersten 48 Stunden der Vermehrung steil an, während die zugeordneten Trübungskurven einen allmählichen Anstieg aufweisen. Nach 48 Stunden läßt das Leuchten allerdings auch rapid nach, obwohl die Trübung weiterhin stetig zunimmt. Die schwächeren KCl-Konzentrationen mit Glyzerin zeigen dagegen während der ganzen Versuchsdauer eine gute Übereinstimmung zwischen Trübung bzw. Vermehrung und Lichtentwicklung.

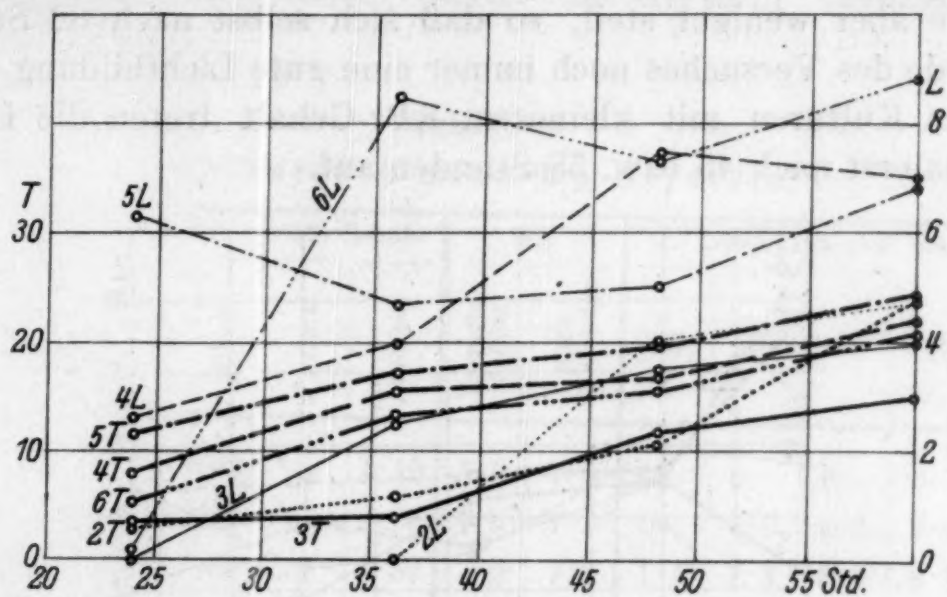


Fig. 16.

KBr - V e r s u c h e .

Bei diesen Versuchsreihen wurde das KCl durch KBr äquivalent ersetzt, so daß auch hier dieselben osmotischen Verhältnisse obwalten. In Tabelle 7 sind die Zusammensetzungen der Nährlösungen, die p_H -Zahlen und die Leuchtgrade nach den verschiedenen Wachstumszeiten zusammengefaßt.

Tabelle 7.
KBr-Versuch ohne Glyzerin.

Nummer der Kultur	cm ³				KBr-Gehalt		p_H		Leuchtgrad nach Stunden				
	Stamm-Bouillon	2-n.-KBr-Lösung	H ₂ O	Summe	normal	Prozent	Versuchs-anfang	Nach 82 Stunden	35	45	58	70	82
1	50	5	45	100	1/10	1·19	7·0	7·0	0	0	0	0	0
2	50	10	40	100	2/10	2·38	7·0	7·4	8	3·8	3·9	2·8	0
3	50	15	35	100	3/10	3·57	7·0	7·5	2·3	5·0	4·5	1·8	1·6
4	50	20	30	100	4/10	4·76	7·0	7·4	5·4	6·0	3·2	2·6	4·9
5	50	25	25	100	5/10	5·95	7·0	7·3	9·7	5·3	5·2	5·0	4·7
6	50	30	20	100	6/10	7·14	7·0	7·2	11·3	5·0	3·0	3·9	2·0

Schon nach 35 Stunden ist in der Kultur 6 die größte überhaupt beobachtete Leuchtstärke erreicht, also in der Probe mit 6/10 n. KBr. Diese starke Lichtstrahlung hat jedoch nur eine sehr kurze Dauer, denn nach weiteren zehn Stunden ist sie unter die Hälfte zurückgegangen, um in der Folge allmählich noch weiter zu fallen. Auch in der Probe 5 mit 1/2 n. KBr ist ebenfalls nach 35stündigem Wachstum der für dieses Röhrchen höchste Leuchtwert erreicht, der aber absolut kleiner ist als bei 6. Der Rückgang erfolgte aber weniger steil, so daß sich selbst nach 82 Stunden am Ende des Versuches noch immer eine gute Lichtbildung zeigte. Bei den Kulturen mit kleinerem KBr-Gehalt treten die Leuchtmaxima erst nach 45 bzw. 58 Stunden auf.

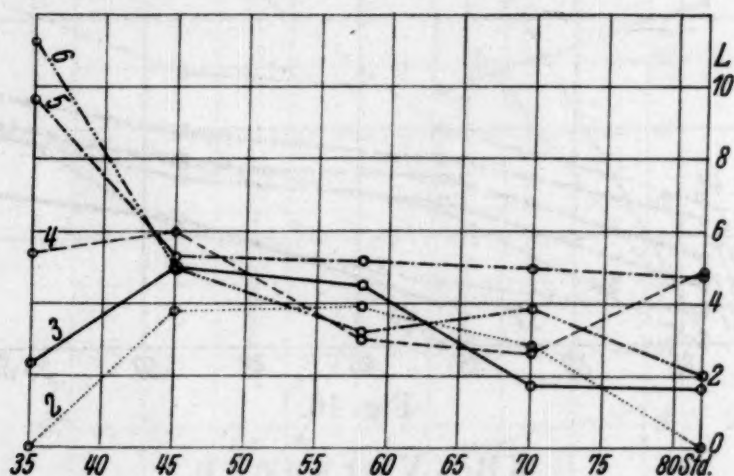


Fig. 17.

Diese Verhältnisse zeigen sich in der graphischen Darstellung der Fig. 17 besonders deutlich. *Im allgemeinen bewirkt das KBr einen sehr raschen Anstieg des Leuchtens innerhalb der ersten 35 Wachstumsstunden, wenn es in der Menge von 4/10—5/10 normal angewendet wird.*

Mit abnehmender Dosis tritt diese rapide Wirkung immer mehr zurück. Es werden dann aber auch nur geringe Lichtmengen ausgesandt. Die stimulierenden Eigenschaften der größeren Konzentrationen sind bei KBr viel ausgeprägter als bei KCl oder gar NaCl. Dafür ist bei KCl der Rückgang des Leuchtens bei den optimalen Konzentrationen sanfter und weniger steil.

Auch hier ändert die Anwesenheit von *Glyzerin* die Leuchtverhältnisse einschneidend. Tabelle 8 zeigt den Aufbau und die Ergebnisse einer KBr-Versuchsreihe *mit Glyzerin*.

Es bleibt wohl auch hier der Probe 6 das Leuchtmaximum erhalten, das aber niedriger liegt als ohne *Glyzerin*. Nach 45 Stunden weist jedoch das Röhrchen 3 die größte Lichtintensität

auf, die jener der Probe 6 nach 35 Stunden sehr nahe kommt. In diesem Leuchtstadium verbleibt nun die Kultur 3 bis zu etwa 70 Stunden, um dann rasch fast zu erlöschen. Die Proben 4 und 5 erreichen diese Leuchtgrade überhaupt nicht, obwohl gerade die Kultur 5 selbst nach 82 Stunden noch gut leuchtet.. Die p_H -Zahlen lassen erkennen, daß die 6/10 n. KBr enthaltenden Kulturen wenig alkalisch geworden sind und trotzdem bei $p_H = 7.2$ die Leuchtmaxima aufweisen, einerlei ob Glyzerin vorhanden ist oder nicht.

Tabelle 8.
KBr-Versuch mit 0.69% Glyzerin.

Nummer der Kultur	cm ³					KBr-Gehalt		p_H		Leuchtgrad nach Stunden				
	Stamm-Bouillon	1/2-Mol-Glyzerinlsg.	2-n.-KBr-Lösung	H ₂ O	Summe	normal	Prozent	Versuchs-anfang	Nach 82 Stunden	35	45	58	70	82
1	50	15	5	30	100	1/10	1.19	7.0	7.0	0	0	0	0	0
2	50	15	10	25	100	2/10	2.38	7.0	7.2	0	4.0	6.5	7.0	0
3	50	15	15	20	100	3/10	3.57	7.0	7.3	1.4	7.3	8.0	8.3	2.0
4	50	15	20	15	100	4/10	4.76	7.0	7.3	3.1	5.7	5.0	4.0	3.8
5	50	15	25	10	100	5/10	5.95	7.0	7.2	3.9	6.0	6.2	4.9	6.0
6	50	15	30	5	100	6/10	7.14	7.0	7.2	9.2	4.0	6.8	4.0	3.5

In Figur 18 sind diese Verhältnisse in Kurven dargestellt, welche die Verschiedenheit gegenüber dem Leuchten ohne Glyzerinzusatz gut erkennen lassen. Die Kurven mit Ausnahme der dem

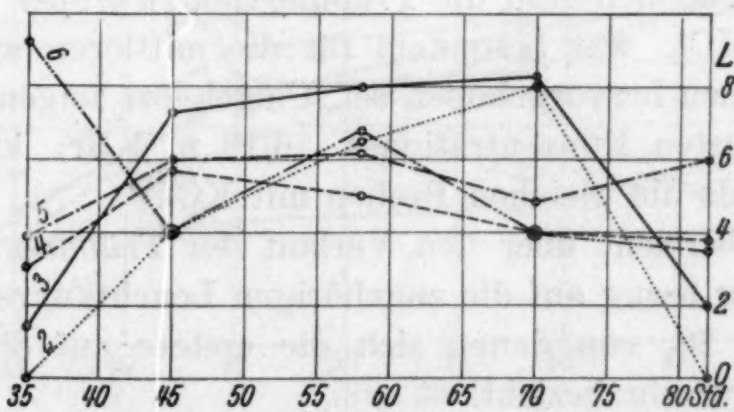


Fig. 18.

Röhrchen 6 zugeordneten verlaufen höher und langsamer ansteigend, während die Größe der Leuchtgrade nach den ersten 35 Stunden beim Glyzerinzusatz vermindert erscheint. Besonders in den Röhrchen mittlerer Konzentration ist die Leuchtfähigkeit

nicht unwesentlich gesteigert und verlängert, was übrigens auch für das Röhrchen 2 mit 2/10 n. KBr zutrifft (Kurve 2). Der Verlauf des Leuchtens im Röhrchen 6 hat sich durch die Glyzerinzugabe nicht wesentlich geändert. Im Vergleich zum NaBr ist die Förderung des Leuchtens durch KBr mit und ohne Glyzerin nur als gering zu bezeichnen.

Auch die *Kulturtrübungen* beim Wachstum werden durch KBr anders beeinflusst als durch KCl, wie aus der folgenden Zusammenstellung der *Trübungszahlen* der KBr-Versuchsreihen zu entnehmen ist.

Trübungszahlen der KBr-Versuchsreihen.

Kultur	Nr.	Trübungszahl nach Stunden			
		35	45	58	70
KBr + Glyzerin	2	5·6	14·6	23·6	36·6
	3	10·7	19·7	31·2	43·2
	4	15·0	22·0	37·5	30·5
	5	17·4	19·4	20·7	27·4
	6	8·3	10·0	14·0	18·0
KBr	2	8·5	18·2	26·9	31·2
	3	12·7	22·7	28·7	31·7
	4	15·7	27·2	29·2	36·2
	5	9·6	23·7	24·9	34·6
	6	9·2	11·2	12·2	17·2

Im allgemeinen sind die *Trübungszahlen* größer als bei den Proben mit KCl, was besonders für die mittleren und niederen Konzentrationen hervorgehoben sei. Umgekehrt zeigen die Proben mit den höchsten Konzentrationen (6/10 n. KBr) kleinere Trübungswerte als die gleichen Proben mit KCl.

Eine Übersicht über den Verlauf der *Trübungen* bzw. des Wachstums in bezug auf die zugehörigen Leuchtkurven geben die Fig. 19 und 20, von denen sich die erstere auf die Versuchsreihe mit Glyzerin bezieht.

Die Kurven 3 *T*, 4 *T* und 5 *T* der Fig. 19 verlaufen ansteigend mit fortschreitender Wachstumszeit und dabei divergierend, während beim Mangel an Glyzerin dieselben sanfter ansteigen und nicht auseinandergehen (Fig. 20). Bei niedriger Konzentration bewirkt der Glyzerinzusatz einen etwas höheren An-

stieg (Fig. 19, 2 T). Die Trübungen in den Proben 6 mit 6/10 n. KBr mit oder ohne Glyzerin verlaufen annähernd gleich. Zwischen den Leuchtgraden und den zugehörigen Trübungen herrschen bei den KBr-Versuchen ohne Rücksicht auf den Glyzerinzusatz mehr oder

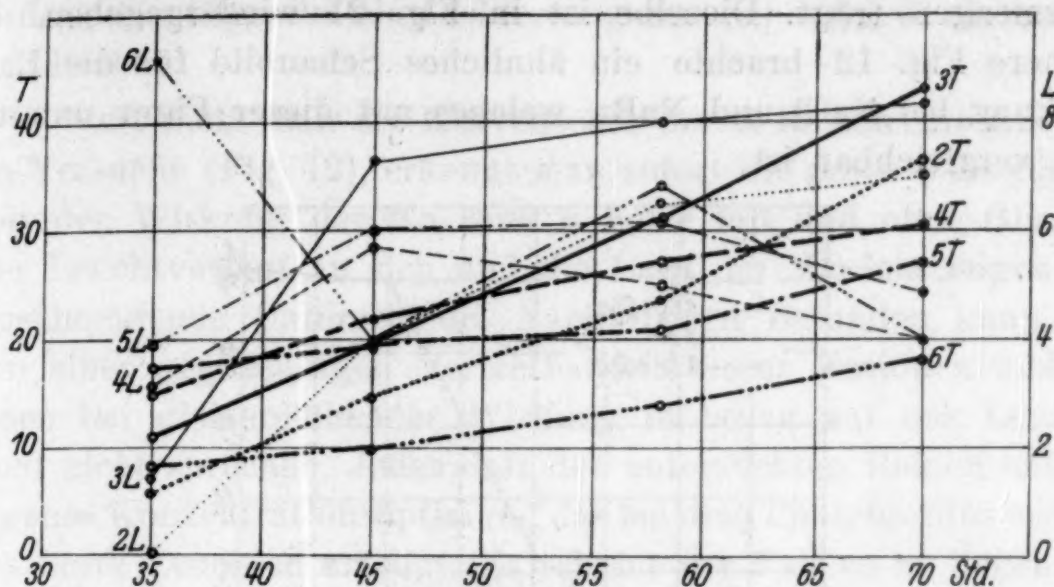


Fig. 19.

minder auffallende Unstimmigkeiten. Vielfach entsprechen geringe Trübungswerte hohen Leuchtgraden und umgekehrt. Letzteres zeigt sich besonders bei den Proben ohne Glyzerin in den Wachstumszeiten nach 45 Stunden und bei den mittleren Kon-

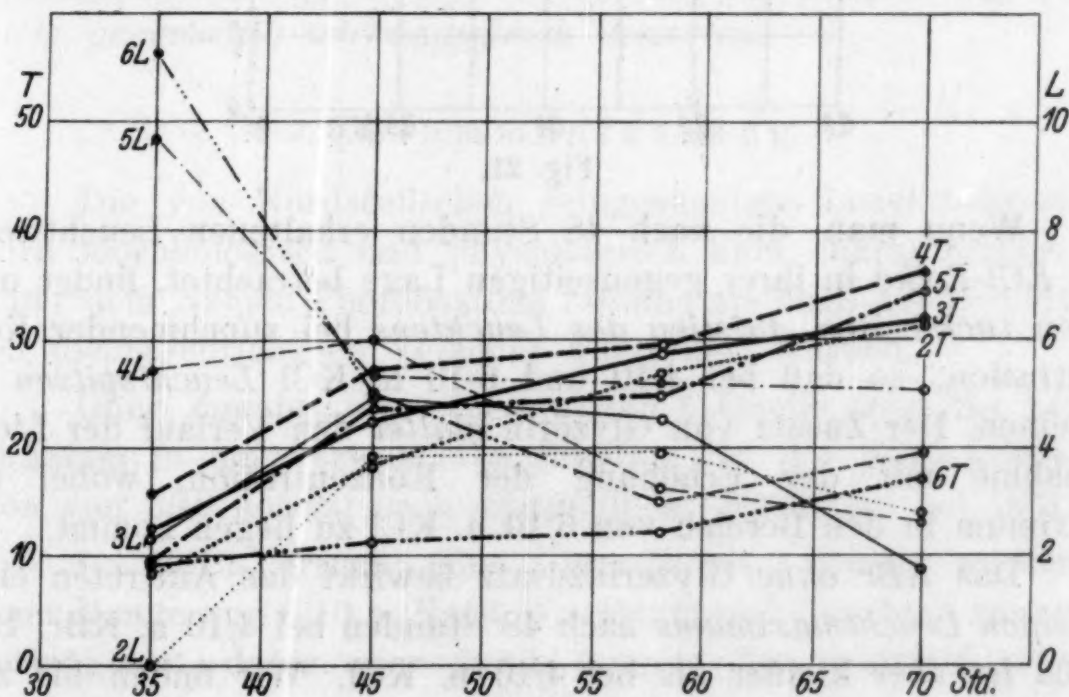


Fig. 20.

zentrationen (2, 3 und 4 der Fig. 20), während die entsprechenden Kulturen mit Glyzerin eine bessere Übereinstimmung in diesen Konzentrationsbereichen aufweisen.

Um die Wirkung der Salze KCl und KBr ohne und mit Glyzerin klar zu überschauen, erscheint es zweckmäßig, die Größe

der Leuchtgrade in jedem Röhrchen, also bei jeder Konzentration dieser Salze, nach einer bestimmten Wachstumszeit herauszuheben und mit diesen Werten eine graphische Darstellung anzufertigen, bei der die Abszisse die Marken in Zehntelnormal-Salzmengen trägt. Dieselbe ist in Fig. 21 wiedergegeben. Die frühere Fig. 12 brachte ein ähnliches Schaubild für die Lichtwirkung bei NaCl und NaBr, welches mit dieser Figur unmittelbar vergleichbar ist.

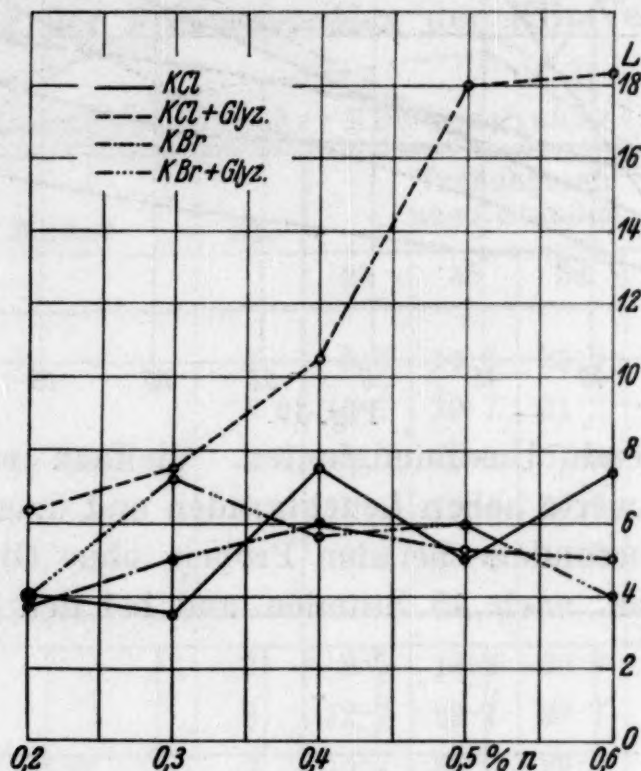


Fig. 21.

Wenn man die nach 48 Stunden erhaltenen Leuchtwerte der *KCl-Reihe* in ihrer gegenseitigen Lage betrachtet, findet man einen *ruckweisen Aufstieg des Leuchtens* bei zunehmender Konzentration, so daß bei 4/10 und 6/10 n. KCl *Leuchtspitzen* erscheinen. Der Zusatz von Glyzerin *glättet* den Verlauf der Lichtzunahme mit der Erhöhung der Konzentration, wobei das Maximum in den Bereich von 6/10 n. KCl zu liegen kommt.

Das *KBr ohne Glyzerinzusatz* bewirkt das Auftreten eines *einzigsten Leuchtmaximums* nach 48 Stunden bei 4/10 n. KBr. Dasselbe ist aber kleiner als bei 4/10 n. KCl. Wir finden bis zum Maximum einen fast linearen sehr scharfen Anstieg und von dort weg einen fast ebenso gestalteten Abfall. Wenn wir *Glyzerin* zusetzen, erhalten wir auch bei der KBr-Reihe *zwei Leuchtspitzen*, eine bei 3/10 n. KBr und eine andere und geringere bei 5/10 n. KBr. Die Verbindung der Leuchtgrade dieser KBr-Glyzerinreihe ergibt eine Schaulinie, die einen ähnlichen Verlauf auf-

weist wie jene der KCl-Proben *ohne* Glyzerin, *aber gegen die geringere Konzentration zu verschoben*. Im Falle des KBr wirkt demnach der Glyzerinzusatz in bezug auf die Bildung von Leuchtspitzen *gerade umgekehrt* wie bei KCl. Bei den KBr-Reihen fördert das Glyzerin die Lichterzeugung viel weniger als bei den KCl-Proben.

Vergleicht man die Kurvenschar der K-Reihen mit jener der Na-Versuche (Fig. 12), erkennt man sofort die große Verschiedenheit der Wirkung der Na- und K-Salze mit und ohne Glyzerin. Der Leuchtverlauf an sich und die Lage der Maxima zeigen sehr einschneidende Unterschiede. Nach diesen Befunden kann man von einer gegenseitigen Vertretbarkeit dieser Kationen und Anionen bei gleichbleibender Wirkung in bezug auf das Leuchten wohl nicht sprechen. Jedes Salz der untersuchten Reihen hat sein eigenes Konzentrationsoptimum, das bei dem Photobazillus radians das beste Leuchten erzeugt. Es scheint der Fall so zu liegen, daß *die verschiedenen Kationen und Anionen die Bakterien veranlassen, ihre eigenen osmotischen Plasmaverhältnisse fallweise einzustellen*. In dieser Weise dürften sich besonders die Kationen (Cl' und Br') bemerkbar machen. *Jedenfalls können sich die untersuchten Salze, auch in isotonischen Lösungen angewendet, nicht gegenseitig wirkungsgleich vertreten.*

Zusammenfassung.

Die von Nordseefischen reingezüchtete Leuchtbakterienart wird morphologisch und physiologisch kurz charakterisiert und unter dem Namen Photobazillus radians als neue Art geführt, mit der die beschriebenen Versuche ausgeführt wurden.

Ohne Zugabe einer besonderen C-Quelle tritt das Leucht-optimum in der verwendeten Bouillon bei der NaCl-Konzentration von 3/10 normal nach 48stündigem Wachstum bei 16° C ein.

Im NaCl-Versuch ohne Glyzerin als C-Quelle werden bei einer Menge von 6/10 n. NaCl Wachstum und Leuchten wesentlich verlangsamt, dafür aber durch längere Zeit steigend erhalten.

Die mit Glyzerin kombinierten NaCl-Kulturen zeigen ihr optimales Leuchten bei einer Kochsalzmenge von ebenfalls 3/10 normal nach 48stündiger Zucht, jedoch wird dasselbe knapp an die Leuchtstärke der Probe mit 4/10 n. NaCl herabgedrückt. Glyzerin schwächt im Falle der NaCl-Kulturen das Leuchten sehr beträchtlich bei niedrigeren Konzentrationen als 3/10 normal, hebt

dasselbe aber für die höheren Konzentrationen über 4/10 normal NaCl in den Wachstumszeiten nach 65 Stunden.

NaBr ohne Glyzerin wirkt in einer Menge von 5/10 normal nach 48 Stunden optimal auf das Leuchten, wobei dasselbe schon nach 22stündiger Kultur stark zu bemerken ist.

Bei NaBr *mit* Glyzerin wird die Leuchtfähigkeit sehr ausgiebig in den Proben von 3/10 bis 6/10 normal gebessert, wobei das Optimum nach 48 Stunden in der Probe mit 6/10 normal festzustellen ist, dem sich die Leuchtgrade der Röhren 4 und 5 aber sehr nähern.

In den NaBr-Kulturen mit Glyzerin geht aber das Leuchten nach 48 Stunden rasch und stark zurück.

Bei demselben Kation Na⁺ ist die Wirkung der Anionen Cl⁻ und Br⁻ derart verschieden, daß eine gegenseitige Vertretbarkeit der Salze NaCl und NaBr mit gleicher Wirksamkeit in isotonischen Lösungen nicht möglich ist. Die Anionen äußern hinsichtlich der Lichterzeugung unterschiedliche Wirkungen.

KCl in einer Konzentration von 6/10 normal ohne Glyzerin ruft nach 37 Stunden ein Leuchtoptimum hervor, das nach einem leichten Rückgange in der Folge beibehalten wird. Es ist aber viel kleiner, als es bei NaCl in einer Konzentration von 3/10 normal nach 48 Stunden erreicht wird. Zur Erreichung eines raschen Leuchtanstieges braucht man bei Anwendung von KCl an Stelle des NaCl eine weit höhere Konzentration.

Die Beigabe von Glyzerin in diesen KCl-Versuchsreihen läßt diese Verschiebung in den Bereich höherer Konzentrationen besonders deutlich hervortreten. Nach 48 Stunden wird ein sehr hoch liegendes Optimum des Leuchtens bei 6/10 n. KCl erreicht, dem sich die Leuchtstärke der Probe mit 5/10 n. KCl sehr nähert.

Das KBr wirkt in den ersten 35 Stunden des Wachstums auf das Leuchten in Mengen von 5/10 bis 6/10 normal außerordentlich stimulierend, denn nach dieser Zeit ist bereits das Leuchtoptimum bei letzter Konzentration erreicht.

Die Wirkung dieser optimalen Mengen bremst ein Glyzerinzusatz in den ersten Züchtungszeiten, was besonders für 5/10 normal zum Ausdruck kommt. In den folgenden Wachstumszeiten fördert das Glyzerin die Lichtbildung.

Die K-Reihenversuche zeigen ebenfalls eine verschiedene Einflußnahme der beiden Anionen auf die Lichterzeugung bei den verschiedenen Salzmengen.

Die versuchten Kaliumsalze zeigen die bessere Wirkung auf das Leuchten in höheren Konzentrationen von 5/10—6/10 normal.

Das Kation K^+ beeinflusst den Leuchtprozeß anders als Na^+ , weshalb es auch letzteres nicht vollwertig isotonisch dabei zu vertreten vermag.

KCl und KBr bewirken eine Neigung zur Verklebung der Mikrobenzellen in den Kulturen, besonders bei stärkeren Konzentrationen, während diese Erscheinung in den Na-Kulturen nur bei großem Salzreichtum eintritt.

Wegen dieser Verklebungserscheinungen sind die Trübungsmessungen nur mit Vorsicht zur Bestimmung der Vermehrung verwendbar.

Es scheint das stärkere Leuchten keineswegs immer mit einer größeren Zellvermehrung zusammenzuhängen und umgekehrt trotz zunehmender Trübung die Lichterzeugung nicht nur nicht zu steigen, sondern bei höheren Konzentrationen sogar zu fallen.

Tafelerklärung.

- Fig. 1. Hängender Tropfen, hergestellt in 0.3 n. NaCl-Lösung mit einer 24stündigen Agarkultur bei 18° C, mit JJK-Lösung behandelt. 1300fach vergr.
- Fig. 2. 36stündige Oberflächenkolonie auf Fischgelatine. 30fach vergr.
- Fig. 3. Ausstrich der Aufschwemmung in 0.3 n. NaCl-Lösung einer 24stündigen Fischagarkultur, bei 18° C gezüchtet. Färbung mit wässriger Methylenblaulösung. 1300fach vergr.
- Fig. 4. Ausstrich wie Fig. 3, jedoch mit verdünnter Karbolfuchsinlösung gefärbt. 1300fach vergr.
- Fig. 5. Klatschpräparat einer 72stündigen Oberflächenkolonie von einer neutralen Fischgelatineplatte, mit wässriger Methylenblaulösung tingiert. 1300fach vergr.
- Fig. 6. Ausstrich von einer Gelatineplatten-Oberflächenkolonie nach 48stündigem Wachstum bei 16° C. Methylenblaufärbung. 1300fach vergr.
- Fig. 7 u. 8. Ausstriche einer 20stündigen Fischagarkultur, bei 12° C gezüchtet. $\frac{1}{3}$ Karbolfuchsinfärbung nach Fixierung in Osmiumsäuredämpfen. 750fach vergr.
- Fig. 9. Innenstrukturen des *Photobacillus radians*. Nach Ausstrichpräparaten gezeichnet, die einer Aufschwemmung in 0.3 n. NaCl-Lösung entstammen. Färbung mit Methylenblau. Zirka 3000fach vergr.
- Fig. 10. Positiv einer Schwärzungsreihe von den Kulturen mit verschiedenem NaCl-Gehalt, oben ohne und unten mit einem Glyzerinzusatz. Die Zahlen geben die Kulturnummern in der Reihe und den Zehntelnormalgehalt von Salz an.

Über „Ringverengerung“ bei der Bildung von inneren Äthern (Oxyden) aus Glykolen (Oxidotetradekan aus 1, 14-Tetradekandiol)

Von

ADOLF FRANKE, ALFRED KROUPA und THEODORA PANZER

Aus dem Analytischen Laboratorium der Universität in Wien

(Vorgelegt in der Sitzung am 28. Jänner 1932)

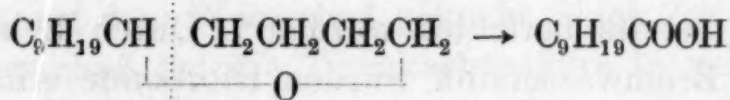
Über die Einwirkung von Schwefelsäure auf höhere di-primäre Glykole liegt bereits eine Reihe von Untersuchungen vor¹. In Fortsetzung dieser Arbeiten wurde nun das Verhalten von 1, 14-Tetradekandiol bei der Wasserabspaltung mit Schwefelsäure untersucht. Das Glykol wurde im wesentlichen nach den Angaben von CHUIT² dargestellt, nur bei der Reduktion des Dodekamethylen-dikarbonsäureesters erwies es sich als vorteilhaft, statt in Äthylalkohol in absolutem Amylalkohol zu reduzieren, worüber im experimentellen Teil dieser Arbeit ausführlich berichtet wird. Bei der Behandlung mit Schwefelsäure gab das 1, 14-Tetradekandiol einen Körper von der Bruttoformel $C_{14}H_{28}O$, dem entsprechend seinem Siedepunkt, seiner Beständigkeit gegen Kaliumpermanganat und metallisches Natrium bzw. Kalium Oxydstruktur zukommen muß. Bei der Oxydation in Azetonlösung³ wurde in guter Ausbeute *n*-Kaprinsäure erhalten, die durch das Äquivalentgewicht, den Schmelzpunkt des Amids und den Mischschmelzpunkt mit *n*-Kaprinsäureamid nachgewiesen wurde. Bernsteinsäure und Oxalsäure konnten nicht aufgefunden werden, während beide Säuren bei der Oxydation von Oxyden mit wässriger Permanganatlösung bisher stets in reichlicher Menge gefunden wurden. Der Grund für das Fehlen der Bernsteinsäure liegt in der geringen Beständigkeit dieser Säure gegen Permanganat in Azetonlösung, während sie gegen wässrige Permanganatlösung weitgehend be-

¹ Vgl. FRANKE und KROUPA, Monatsh. Chem. 56, 1930, S. 331—346, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 567—582. Dasselbst ausführliche Literaturangaben.

² CHUIT, Helv. chim. Acta 9, 1926, S. 272.

³ Wässrige Kaliumpermanganatlösung reagiert mit höheren Oxyden wegen ihrer Unlöslichkeit in Wasser nur äußerst langsam.

ständig ist. Das ergab sich einerseits durch Oxydationsversuche an Bernsteinsäure in wässriger und azetonischer Lösung, anderseits durch Vergleichsversuche am Oxidodekan ($C_{10}H_{20}O$), dessen Oxydationsprodukte bei der Oxydation in wässriger Permanganatlösung gut bekannt sind (Bernsteinsäure, Oxalsäure, Kapronsäure). Mit Permanganat in Azetonlösung wurde *n*-Kapronsäure⁴ erhalten, dagegen weder Bernsteinsäure noch Oxalsäure. Das Fehlen der Bernsteinsäure bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat in Azetonlösung ist damit aufgeklärt und es ergibt sich aus dem Auftreten von *n*-Kapronsäure bei der Oxydation von Oxidotetradekan der Schluß, daß diesem Körper ebenso wie den bisher untersuchten höheren Oxyden 1,5-Struktur zukommt⁵.



Die Reaktion hat also auch in diesem Fall, wo sich die Hydroxyle in 1,14-Stellung befinden, einen analogen Verlauf genommen wie in den bisher untersuchten Fällen. Allerdings ist die Ausbeute beim Oxidotetradekan schlechter als beim Oxidodekan und Oxidododekan. Allgemein läßt sich sagen, daß in den bisher untersuchten Fällen die Ausbeute an Oxyd um so geringer war, je weiter im Ausgangsmaterial die Hydroxylgruppen voneinander entfernt standen.

Es bleibt nun beim Oxidotetradekan ebenso wie bei den anderen höheren Oxyden die Frage ungeklärt, ob *nur* 1,5-Oxyd entsteht oder ob diesem Isomere beigemischt sind. Die theoretischen Erwägungen, die das Auftreten von Isomeren erwarten lassen, sind bereits in einer früheren Arbeit⁶ mitgeteilt, so daß sich deren Wiederholung erübrigt. Es soll an dieser Stelle nur darauf hingewiesen werden, daß bei dem dort angenommenen Reaktionsmechanismus, der nunmehr⁷ auch experimentell gestützt

⁴ Die Säure wurde über ihr Amid identifiziert.

⁵ Die ausführliche Begründung dafür, daß der Oxydationsverlauf so zu deuten ist, findet sich Monatsh. Chem. 43, 1922, S. 178, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 131, 1922, S. 178.

⁶ FRANKE und KROUPA, Monatsh. Chem. 56, 1930, S. 331—346, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 567—582.

⁷ Die diesbezüglichen Arbeiten von FRANKE und Mitarbeitern werden demnächst veröffentlicht.

ist, eine Ringverengung auch über den sechsgliedrigen Ring hinaus möglich scheint, so daß vom theoretischen Standpunkt aus auch mit der Möglichkeit des Auftretens von 1,4-Oxyden gerechnet werden muß. Wir sind derzeit mit der Aufklärung dieser Fragen beschäftigt, und es ist uns in einem Falle, nämlich beim Oxidohexan, bereits gelungen, den Nachweis für das Vorhandensein von Isomeren zu führen, worüber in nächster Zeit berichtet wird. Die Schwierigkeit des Nachweises von Isomeren liegt darin, daß die Oxyde indifferente Flüssigkeiten sind und Isomere (mit Ausnahme der ω , ω' -Oxyde) keine genügend große Siedepunktsdifferenz erwarten lassen, um sie durch Destillation mit Sicherheit zu erkennen oder gar zu trennen. Es scheint uns daher nötig, die Oxyde in kristallisierte Derivate überzuführen, um durch Untersuchung dieser die Frage zu klären. Über einen derartigen Versuch ist bereits berichtet worden⁸. Durch Behandlung von Oxyden mit Bromwasserstoff wurden Dibromide erhalten, welche über die Nitrile in Dikarbonsäuren (wir haben sie vorläufig nach ihrer Entstehung als Alkylpimelinsäuren bezeichnet) übergeführt wurden. Eine Synthese von Alkylpimelinsäuren wird derzeit durchgeführt, um einen Vergleich mit den aus Oxyden erhaltenen Produkten zu ermöglichen. Geeigneter für die Untersuchung der Oxyde erscheinen uns aber die Ketonsäuren, welche man als Zwischenprodukte der Oxydation der Oxyde unter geeigneten Versuchsbedingungen fassen kann. Über die Darstellung dieser Körper sowie über den Vergleich mit Ketonsäuren, die wir durch eindeutige Synthesen darstellen, wollen wir erst berichten, sobald ein größeres Beobachtungsmaterial vorliegt.

Experimenteller Teil.

A. Darstellung des Ausgangsmaterials.

1,10-Dekandiol⁹ wurde durch Reduktion von Sebazinsäurediäthylester dargestellt. Durch Anwendung von konstant siedendem Ester (innerhalb eines Grades) konnten unter den gleichen Versuchsbedingungen wie früher Ausbeuten bis 84% der Theorie erhalten werden. Das Glykol wurde mit trockenem Bromwasserstoff in 1,10-Dibromdekan⁹ übergeführt. Ausbeute 87% der Theorie.

⁸ FRANKE und KROUPA, Monatsh. Chem. 56, 1930, S. 347—357, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 583—593.

⁹ Ausführliche Literaturangaben sowie Arbeitsvorschriften finden sich Monatsh. Chem. 56, 1930, S. 341, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 576.

1, 12-Dodekamethylendikarbonsäure¹⁰.

Zur Darstellung der 1, 12-Dodekamethylendikarbonsäure wurden 9.5 g Natrium in 100 g über Bariumoxyd getrocknetem Alkohol gelöst. Das entstandene Natriumäthylat wurde in 66 g eisgekühlten, frisch destillierten Malonester gegossen. Das Gemisch erstarrte zu einer festen Masse, zu welcher allmählich in kleinen Portionen unter fortwährendem Umschütteln 52.5 g Dibromdekan zugefügt wurden. Das Reaktionsgemisch, ein dickflüssiger Brei, wurde nun unter wiederholtem Umschütteln unter Rückflußkühlung einen Tag lang auf dem Wasserbad gekocht, wobei sich die Flüssigkeit braun färbte. Nun wurde mit einer Lösung von 50 g Kaliumhydroxyd in wenig Wasser versetzt und das Gemisch zur Verseifung des Dodekamethylentetrakarbonsäureesters drei Stunden auf dem Wasserbad gekocht. Nach Zusatz von Salzsäure im Überschuß fiel die Tetrakarbonsäure in gelben Flocken aus, welche leicht in Äther gelöst werden konnten. Nach Abdestillieren des Äthers wurde der Rückstand, eine schmutziggraue Kristallmasse, zur Abspaltung von Kohlendioxyd im Ölbad langsam auf 180° erhitzt. Nach dem Erkalten schied sich die unreine Dikarbonsäure in Form einer graubraunen Kristallmasse ab.

Dimethylester der Dodekamethylendikarbonsäure.

Zur Darstellung des Esters wurde die ungereinigte Säure in 50 cm³ absolutem Methylalkohol gelöst, dazu langsam eine Mischung von 100 cm³ absolutem Methylalkohol und 30 cm³ konzentrierte Schwefelsäure gegeben und das Gemisch fünf Stunden am Wasserbad gekocht. Hierauf wurde auf Eis ausgegossen und der Ester mit Äther aufgenommen. Die ätherische Lösung des Esters wurde mit Sodalösung bis zum Verschwinden der sauren Reaktion durchgeschüttelt, mit Wasser nachgewaschen und mit Chlorkalzium getrocknet. Bei der Destillation im Vakuum ging der Ester zwischen 195 und 197° über, Hauptmenge bei 196° (9.5 mm Druck). Aus 52.5 g Dibromid wurden 35.3 g Ester erhalten, das sind 70% der Theorie.

¹⁰ BARROWCLIFF und POWER, Journ. Chem. Soc. London 91, 1907, S. 568; FRANKE und HANKAM, Monatsh. Chem. 31, 1910, S. 188, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 119, 1910, S. 188; CHUIT, Helv. chim. acta 9, 1926, S. 271; über eine andere Darstellungsweise vgl. Ber. D. ch. G. 44, 1911, S. 1923.

Äquivalentgewicht des Esters:

Einwaage: 0.2277 g. Zugefügt wurden 50 cm³ n/10 alkoholische Natronlauge (f 0.9964) und 2 Stunden gekocht. Zum Zurücktiteren wurden 34.00 cm³ n/10 Salzsäure verbraucht.

Äquivalentgewicht. Ber. 143.

Gef. 144.

1, 14-Tetradekandiol ¹¹.

1. Darstellung in äthylalkoholischer Lösung.

Eine Lösung von 72 g des reinen Dimethylesters der Dodekamethylendikarbonsäure in 690 g über Bariumoxyd getrocknetem Äthylalkohol wurde auf 62 g blankes Natrium fließen gelassen. Dabei blieb das Reaktionsprodukt anfangs klar, wurde aber, sobald ungefähr die Hälfte der Lösung zugefügt war, trüb und erstarrte schließlich zu einer Gallerte, die sich auch auf Zusatz von Alkohol nicht löste. Nun wurde so lange erhitzt, bis keine Wasserstoffentwicklung zu bemerken war. Das Reaktionsprodukt wurde vorsichtig mit Wasser versetzt und mit Wasserdampf so lange destilliert, bis der Alkohol abdestilliert war und das Destillat anfang, trüb überzugehen. Im Kolben verblieb eine weiße, dickbreiige Masse, die nicht filtrierbar war. Sie wurde mit kochendem Benzol erschöpfend extrahiert. Beim Erkalten der Benzollösung kristallisierte der größte Teil des Glykols in feinen Nadeln aus. Die Ausbeute war — offenbar infolge des bei der Reduktion entstandenen Niederschlages, der den nichtreduzierten Ester einschloß — schlecht. Aus 72 g Dimethylester wurden 10 g Glykol erhalten, d. s. 22.5% der Theorie.

Die Anteile von Dodekamethylendikarbonsäure, welche der Reduktion entgangen waren, ließen sich aus den Extraktionsrückständen zum größten Teil unverändert zurückgewinnen und wieder weiter verarbeiten. Viel glatter verlief die Reduktion

2. in amylalkoholischer Lösung.

10 g Dodekamethylendikarbonsäuremethylester wurden in 183 g trockenem Amylalkohol gelöst. Diese Lösung wurde in dickem Strahl auf 8.6 g blankes Natrium fließen gelassen und, da die Reaktion wenig heftig vor sich ging, im Ölbad erwärmt. Die Lösung blieb völlig klar. Sobald die Umsetzung vollständig war, wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser verdünnt, wobei sich zwei Schichten abschieden. Nach dem Abtrennen der amylalko-

¹¹ CHUIT, Helv. chim. Acta 9, 1926, S. 272.

holischen Schicht wurde diese mit Wasser gewaschen und zur Vertreibung des Amylalkohols einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Der Destillationsrückstand wurde nach dem Eindampfen und Trocknen über Chlorkalzium mit Benzol ausgekocht. Beim Erkalten kristallisierte das Glykol in schönen Nadeln aus. Nach nochmaligem Umkristallisieren konnte es schmelzpunktsrein erhalten werden (Schmelzpunkt 84.5°). Aus 10 g Dimethylester wurden 4.3 g Glykol erhalten, das sind 53% der Theorie.

B. Darstellung und Strukturbeweis des Oxidotetradekans.

1. Darstellung des Oxyds $C_{14}H_{28}O$.

10 g reinstes 1, 14-Tetradekandiol wurden in 500 g 50%ige Schwefelsäure eingetragen. Das Gemisch wurde allmählich durch vorsichtiges Erhitzen unter Einleiten von überhitztem Wasserdampf konzentriert. Bei einer bestimmten Schwefelsäurekonzentration löste sich das Glykol, und sehr bald waren im Kühler Öltröpfchen zu bemerken. Nun wurde unter möglichster Beibehaltung der Konzentration im Wasserdampfstrom erhitzt, wobei darauf geachtet wurde, daß das Oxyd langsam und gleichmäßig übergehe und kein Geruch nach Schwefeldioxyd auftrete. Gegen Ende der Reaktion mußte immer stärker erhitzt werden, um noch Öl auszutreiben. Sobald Verkohlungen und ein deutlicher Geruch nach Schwefeldioxyd auftrat, wurde unterbrochen.

Das Destillat wurde ausgeäthert. Die vereinigten Ätherauszüge wurden über Chlorkalzium getrocknet, der Äther abdestilliert und der Rückstand einer Vakuumdestillation unterworfen. Das Sieden begann bei einem Druck von 12 mm bei 135° und die Hauptmenge ging bis 160° über. Dabei wurden an Rohprodukt aus je 10 g Glykol 2.6 g Oxyd erhalten. 5 g des Rohproduktes wurden unter gewöhnlichem Druck über metallischem Natrium destilliert, um sie von hydroxylhaltigen Produkten zu befreien. Dabei gingen über:

von $250-257^{\circ}$	1.13 g
„ $257-264^{\circ}$	2.55 g
„ $264-268^{\circ}$	0.92 g

Bei der Destillation unter gewöhnlichem Druck konnten keinerlei Zersetzungserscheinungen wahrgenommen werden. Die Substanz wurde nun nochmals einer Destillation unter gewöhn-

lichem Druck, diesmal ohne Natrium, unterworfen. Dabei gingen über:

von 250—257°	1.2 g
„ 257—265°	2.3 g
„ 265—269°	0.7 g

Die Substanz war nach der Destillation vollkommen wasserhell und etwas dickflüssig.

Zur Reinigung der Substanz von Beimengungen ungesättigter Verbindungen wurde an die einzelnen Fraktionen Brom addiert. Zu diesem Zwecke wurde die Substanz in Chloroform gelöst und gut gekühlt. Dabei verbrauchten:

Fraktion 250—257° (1.2 g)	0.4 g Br
„ 257—265° (2.3 g)	0.45 g Br
„ 265—269° (0.7 g)	0.15 g Br

Die drei Fraktionen¹² wurden vereinigt, mit Wasser gut gewaschen und mit Chlorkalzium getrocknet. Nach dem Abdampfen des Chloroforms wurde im Vakuum fraktioniert, um das Oxyd von den ungesättigten Verbindungen, die nunmehr in Form von Bromadditionsprodukten vorlagen, zu trennen.

Bei einem Druck von 11 mm begann das Sieden bei 127°. Die Hauptmenge ging zwischen 134 und 142° über. Beim Öffnen des Kolbens war kaum Bromwasserstoff zu bemerken, ein Zeichen, daß keine sehr starke Zersetzung eingetreten war. Im Kolben blieb ein brauner, sehr dickflüssiger Körper zurück.

Nun wurde das Produkt einer Vakuumdestillation über metallischem Natrium unterworfen, um das noch vorhandene Brom zu binden. Bei 12 mm gingen über:

von 127—134°	0.53 g
„ 134—139°	1.7 g
„ 139—141°	1.0 g

Das Produkt war ein gelb gefärbtes Öl.

Bei nochmaliger Destillation der Hauptfraktion unter gewöhnlichem Druck wurden zwei Fraktionen, die erste von 250 bis 260°, die zweite von 263—267° aufgefangen. Auch dieses Produkt war noch gelb gefärbt.

Die Hauptfraktion wurde nun auf Halogen geprüft. Dabei konnte ein äußerst geringer Niederschlag von Silberbromid er-

¹² Das Produkt wurde durch Stehen an der Luft braun und schließlich fast schwarz.

halten werden. Schließlich wurde das Oxyd, um es von den letzten Bromresten zu befreien, über metallisches Kalium destilliert. Dabei wurde ein Vorlauf bis zu 259° abgetrennt. Die Hauptfraktion (1.3 g) ging zwischen 259 und 262° über. Dieses Produkt addierte kein Brom mehr.

Elementaranalyse:

- I. 0.1275 g Substanz gaben 0.3759 g CO_2 und $0.1543\text{ g H}_2\text{O}$
 II. 0.1521 g „ „ 0.4483 g CO_2 „ $0.183\text{ g H}_2\text{O}$.
 Gef.: I. C 80.41 , H 13.54 ; II. C 80.38 , H 13.51 .
 Ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}$: C 79.16 , H 13.3 .

Erst nach nochmaliger Destillation konnte endlich ein reines Produkt isoliert werden. Das Oxyd ist ein farbloses, dünnflüssiges Öl von schwachem, eigenartigem Geruch, das bei Atmosphärendruck unzersetzt zwischen 259 und 262° (unkorr.) siedet.

Elementaranalyse:

- I. 0.0744 g Substanz gaben 0.2166 g CO_2 und $0.0864\text{ g H}_2\text{O}$
 II. 0.0879 g „ „ 0.2557 g CO_2 „ $0.1030\text{ g H}_2\text{O}$.
 Gef.: II. C 79.4 , H 13.00 ; II. C 79.34 , H 13.11 .
 Ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}$: C 79.16 , H 13.30 .

Molekulargewichtsbestimmung nach BLEYER-KOHN¹³:

- I. 0.0226 g Substanz gaben, in Anilindampf (Konstante 1060) bei 12 mm vergast, eine Druckerhöhung von 112 mm Paraffinöl.
 II. 0.0238 g Substanz gaben ebenso eine Druckerhöhung von 118 mm .
 Gef.: I. M 213.9 , II. M 213.8 .
 Ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}$: M 212.2 .

2. Oxydation des Oxidotetradekans in Azetonlösung¹⁴.

1.012 g reinstes Oxyd wurden mit 320 cm^3 einer 1% igen Lösung von Kaliumpermanganat in absolutem Azeton (auf $1\text{ Mol C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}$ 6 O) versetzt und bis zur Entfärbung stehen gelassen. Nach 60 Stunden war die Lösung entfärbt.

Nun wurde so lange eine wässrige Lösung von schwefeliger Säure zugesetzt, bis der bei der Oxydation gebildete Braunstein reduziert war. Hierauf wurde die Lösung mit 20% iger Natronlauge deutlich alkalisch gemacht und das Azeton im Wasserdampfstrom abdestilliert. Nach einiger Zeit wurde die übergehende Flüssigkeit trüb und etwas Öl (wahrscheinlich unverändertes

¹³ BLEYER und KOHN, Monatsh. Chem. 20, 1899, S. 505 und 909, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 108, 1899, S. 505 u. 909.

¹⁴ Zur Oxydation in Azetonlösung vgl. SACHS, Ber. D. ch. G. 34, 1901, S. 497; GINSBERG, Ber. D. ch. G. 36, 1903, S. 2708, Anm. 1.

Oxyd) ging über. Diese Fraktion wurde besonders aufgefangen. Sobald kein Öl mehr überging, wurde die Destillation unterbrochen. Nun wurden zum Destillationsrückstand 2 *n*-Schwefelsäure im Überschuß zugegeben und so lange destilliert, bis das Destillat nicht mehr sauer reagierte. Dabei ging ein Öl über, welches in der Vorlage erstarrte und einen deutlich ranzigen Geruch zeigte.

a) Destillat.

Das gesamte wässrige Destillat wurde mit 75 cm³ 2 *n*-Natronlauge deutlich alkalisch gemacht, zur Entfernung des unverbrauchten Oxyds ausgeäthert (es wurden 0.43 g Oxyd zurück-erhalten) und am Wasserbad eingengt. Hierauf wurde mit Schwefelsäure angesäuert und im Apparat nach Schacherl mit Äther extrahiert. Nach dem vorsichtigen Abdampfen des Äthers wurde der Rückstand mit verdünnter Natronlauge neutralisiert. Nun wurde wieder angesäuert, im Apparat von Schacherl mit Äther extrahiert und nach dem Verdampfen des Äthers und Trocknen zur Gewichtskonstanz mit *n*/10-Natronlauge titriert.

Dabei verbrauchten 0.2269 g Säure 13.25 cm³ *n*/10 Natronlauge (*f* 1.0025).
Äquivalentgewicht gef.: 170.8.

Ber. für C₁₀H₂₀O₂: 172.2.

Die Säure wurde nun mit Thionylchlorid über das Säurechlorid nach der von H. MEYER¹⁵ angegebenen Methode in das Säureamid übergeführt. Das Amid wurde mehrmals aus Äther umkristallisiert. Bei einer Schmelzpunktsbestimmung begann es bei 96.5° zu sintern und schmolz klar bei 98°. Ein aus käuflichem Kaprinsäureäthylester auf die gleiche Weise (Verseifung des Esters, Überführen über das Säurechlorid in das Amid) gewonnenes Amid der Kaprinsäure zeigte dasselbe Verhalten. Ein Mischschmelzpunkt der beiden Substanzen zeigte keine Depression.

b) Destillationsrückstand.

Die nach der Wasserdampfdestillation im Kolben verbleibende Flüssigkeit wurde auf ein kleines Volumen eingengt und im Apparat nach Schacherl mit Äther erschöpfend extrahiert. Nach dem Abdampfen des Äthers blieb eine geringe Menge einer öligen Substanz zurück (0.0221 g). Sie wurde im Wasser gelöst

¹⁵ H. MEYER, Monatsh. Chem. 22, 1901, S. 417, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 110, 1901, S. 417.

und mit Kalkwasser titriert. Dazu wurde 1 cm^3 Kalkwasser verbraucht (10 cm^3 Kalkwasser entsprechen 4.4 cm^3 $n/10$ -Salzsäure), dabei fiel kein Niederschlag aus, also keine Oxalsäure. Die angewandte Menge Kalkwasser entspräche etwa 2 mg Bernsteinsäure.

3. Oxydation des 1,5-Oxidodekans.

1,5-Oxidodekan, auf die von A. FRANKE¹⁶ angegebene Weise aus 1,10-Dekandiol gewonnen, wurde nun zum Vergleich des Oxydationsverlaufes in wässriger Lösung auch in azetonischer Lösung mit Kaliumpermanganat oxydiert. Zu diesem Zwecke wurden 1.56 g Oxyd mit 630 cm^3 einer 1%igen Lösung von Kaliumpermanganat in absolutem Azeton bei einer Temperatur von zirka 30° bis zur Entfärbung stehen gelassen (zirka $2\frac{1}{2}$ Tage). Das Azeton wurde abdestilliert und der Braunstein mit saurer Ferrosulfatlösung in Lösung gebracht. Die saure Lösung wurde nun einer Wasserdampfdestillation unterworfen und so lange destilliert, bis das Destillat nicht mehr sauer reagierte.

a) Destillat.

Das Destillat wurde mit $n/2$ -Natronlauge deutlich alkalisch gemacht, zur Entfernung des nicht angegriffenen Oxyds mit Äther ausgeschüttelt (0.8 g) und am Wasserbad etwas eingengt. Nach dem Ansäuern wurde im Apparat nach Schacherl mit Äther erschöpfend extrahiert und der Äther entfernt. Die Säure wurde nun auf die oben angegebene Weise in das Amid übergeführt. Das Amid ließ sich aus Wasser umkristallisieren und zeigte den Schmelzpunkt 98.5° (0.13 g)¹⁷.

b) Destillationsrückstand.

Die im Kolben nach der Wasserdampfdestillation verbleibende Flüssigkeit wurde zur Gewinnung der fixen Säuren im Apparat nach Schacherl mit Äther extrahiert. Nach dem Verdampfen des Äthers blieb eine nur wenig braune ölige Masse zurück (0.1834 g). Bei der Titration mit Kalkwasser (10 cm^3 Kalkwasser entsprechen 4.4 cm^3 $n/10$ -Salzsäure) wurden zirka 35 cm^3 (entsprechend 1.54 cm^3 n -Lauge) verbraucht. Dabei fiel ein brauner, flockiger Niederschlag aus (Eisenhydroxyd). Der Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat angesäuert und mit Äther erschöp-

¹⁶ A. FRANKE, Monatsh. Chem. 53 u. 54, 1929, S. 580, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 138, Suppl. 1929, S. 580.

¹⁷ Schmelzpunkt des Kapronamids 98 bis 100° .

fend extrahiert. Dabei blieb nach dem Verdampfen des Äthers eine ganz geringe Menge eines gelben, öligen Rückstandes (0.0162 g), von dessen weiterer Untersuchung abgesehen wurde.

4. Oxydation von Bernsteinsäure.

a) In azetonischer Lösung.

Eine Lösung von 0.737 g Kaliumpermanganat in 73 g absolutem Azeton wurde mit 0.118 g reiner Bernsteinsäure bei 30 bis 40° stehen gelassen. Sobald die Lösung völlig entfärbt war (nach drei Tagen), wurde das Azeton abdestilliert, der Braunstein durch eine wässrige Lösung von schwefeliger Säure zerstört und die Flüssigkeit eingeeengt. Hierauf wurde im Apparat nach Schacherl erschöpfend extrahiert. Nach dem Verdampfen des Äthers blieben 0.0684 g Bernsteinsäure (Oxalsäure ist keine vorhanden, weil Kalkwasser keine Trübung erzeugt), d. s. 57.9% der angewandten Menge, zurück. Dieser Teil der Bernsteinsäure war der Oxydation entgangen, weil das Permanganat vom Azeton selbst teilweise verbraucht wurde. Ein Kontrollversuch ergab, daß eine gleichprozentige azetonige Permanganatlösung bei 40° nach fünftätigem Stehen entfärbt war.

b) In wässriger Lösung.

Eine Lösung von 0.737 g Kaliumpermanganat in 73 cm³ Wasser wurde mit 0.118 g Bernsteinsäure bei gleicher Temperatur gleich lang wie oben stehen gelassen. Dabei schied sich nur ganz wenig Braunstein ab. Der Braunstein und das noch vorhandene Kaliumpermanganat wurden mit einer wässrigen Lösung von schwefeliger Säure zersetzt und die Lösung eingeeengt. Hierauf wurde im Apparat nach Schacherl mit Äther erschöpfend extrahiert. Nach dem Abdampfen des Äthers blieben 0.1166 g Bernsteinsäure zurück, d. s. 98.7% der angewandten Menge. Beim Versetzen mit Kalkwasser zeigte sich auch hier keine Trübung. Die Bernsteinsäure wurde also in wässriger Lösung unter den gleichen Umständen wie in einer Lösung von absolutem Azeton gar nicht oder nur ganz wenig angegriffen.

Über die Dehydrierung von Sapogenin

Konstitution und Synthese von Sapotalin

Von

ERNST SPÄTH

wirkl. Mitglied der Akademie der Wissenschaften

und

OTTO HROMATKA

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität in Wien

(Vorgelegt in der Sitzung am 25. Februar 1932)

Unter den Reaktionen, welche einen Einblick in die Konstitution komplizierterer hydroaromatischer Systeme gewähren, nimmt die Dehydrierung mit Schwefel, oder besser mit Selen, eine wichtige Stellung ein. Sie hat in neuerer Zeit auch auf dem Gebiete der Sapogenine, der zuckerfreien Abbauprodukte von Saponinen, Anwendung gefunden. Unter den Produkten, die die Dehydrierungsreaktion dieser Stoffe liefert, herrscht ein Kohlenwasserstoff $C_{13}H_{14}$ vor, dessen Pikrat bei $127-128^\circ$ schmilzt; das Styphnat weist den F. P. $152-153^\circ$ auf. RUZICKA¹ stellte fest, daß die Mehrzahl der untersuchten Sapogenine bezüglich dieser Reaktion gleiches Verhalten zeigt, und nannte das wichtige Abbauprodukt $C_{13}H_{14}$ Sapotalin. Die Oxydation mit Kaliumferrizyanid ergab eine Trikarbonsäure, deren Ester rein gefaßt werden konnten; ihre Analyse führte zu dem Schluß, daß die Säure eine Trikarbonsäure des Naphthalins von der Formel $C_{13}H_8O_6$ ist, so daß das Sapotalin die Konstitution eines Trimethylnaphthalins besitzen muß. Über die Stellung der Methylgruppen in der Sapotalinmolekel konnten von RUZICKA keine Aussagen gemacht werden. Ähnliche Stoffe, die wahrscheinlich mit Sapotalin identisch sind, wurden in letzter Zeit auch bei der Dehydrierung anderer Naturstoffe aufgefunden, so aus Amyrinen² und Harzsäuren (Boswellinsäure)³.

¹ L. RUZICKA und A. G. VAN VEEN, Rec. trav. chim. Pays Bas 48, 1929, S. 1022; Z. physiol. Chem. 184, 1929, S. 69.

² L. RUZICKA, H. W. HUYSER, M. PFEIFFER, C. F. SEIDEL, Ann. 471, 1929, S. 21; O. BRUNNER, Monatsh. Chem. 50, 1928, S. 284, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (IIb) 137, 1928, S. 760.

³ K. BEAUCOURT, Monatsh. Chem. 55, 1930, S. 185, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (IIb) 139, 1930, S. 101.

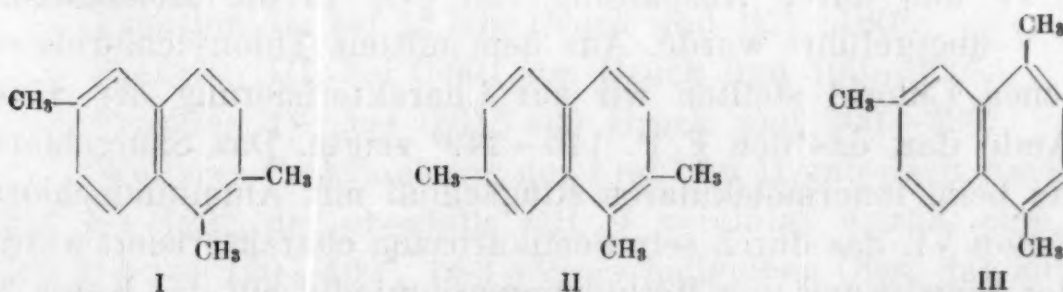
Wir haben die Dehydrierung des Sapotalins näher studiert, erhielten einige bisher nicht beschriebene Dehydrierungsprodukte und konnten schließlich die Konstitution des Sapotalins durch Abbau und Synthese bestimmen. Wie die meisten Autoren vor uns haben wir unsere Untersuchungen am Gypsophila-Sapogenin (Albsapogenin) ausgeführt, das wir aus Merckschem Saponinum purum album gewannen. Wir erhielten bei der Dehydrierung mit Selen in ungefähr 18% Ausbeute als Hauptprodukt Sapotalin, für dessen Pikrat wir den F. P. 127.5—128.5° fanden, während das Styphnat bei 155—157° und das Trinitro-*m*-kresolat bei 151 bis 153° schmolz. Außer Sapotalin konnten wir aus den höher-siedenden Anteilen der Dehydrierungsprodukte noch weitere vier Kohlenwasserstoffe isolieren, die einheitliche Körper vorstellen. Ein Kohlenwasserstoff vom F. P. 126—127° zeigte den Siedepunkt von ungefähr 120° (Luftbadtemperatur) bei 0.0012 mm Hg Druck und lieferte ein Pikrat, dessen F. P. bei 161—163° lag. DIELS⁴ erhielt bei der Dehydrierung des Cholesterins mit Selen einen Kohlenwasserstoff C₁₈H₁₆ vom F. P. 125°, doch gibt er für den Schmelzpunkt des Pikrates 117° an, so daß die Identität dieses Stoffes mit dem von uns aus Sapogenin gewonnenen nicht wahrscheinlich ist. Ein weiteres Dehydrierungsprodukt ging bei 170° und 0.0012 mm Druck über. Der Kohlenwasserstoff bildete farblose Nadeln, die bei 116° schmolzen; das Pikrat zeigt den F. P. 213—215°. Wir fanden ferner zwei schwer flüchtige Kohlenwasserstoffe auf, die durch ihre geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln auffielen und beim Behandeln des Rohproduktes mit Äther zum Teil auskristallisierten. Ihre Trennung war sehr schwierig und ist im experimentellen Teil beschrieben. Der eine Kohlenwasserstoff sublimierte im Hochvakuum bei zirka 210° und wies den F. P. 228—230.5° auf. Ob diese Verbindung eine reine, einheitliche Substanz ist, können wir nicht sicher behaupten. DIELS beschreibt in seiner zitierten Arbeit einen Kohlenwasserstoff C₂₅H₂₄, der nach dem Umkristallisieren aus Eisessig bei 219° schmolz; wir haben diesen Körper nach der Vorschrift von DIELS dargestellt und konnten den Schmelzpunkt desselben auf 227—228° erhöhen; die Mischprobe mit dem aus Sapogenin erhaltenen Körper zeigte jedoch, daß die beiden Stoffe nicht identisch sein können. Aus der bei 220—230° im Hochvakuum übergehenden Fraktion konnten wir noch einen fünften Kohlenwasserstoff gewinnen, dessen

⁴ O. DIELS, W. GÄDKE, P. KÖRDING, *Ann.* 459, 1927, S. 1.

Schmelzpunkt durch mühsames, fortgesetztes Umkristallisieren bis 304—305° gesteigert werden konnte.

Um die Stellung der Methylgruppen am Naphthalinkern der Sapotalinmolekel festzustellen, oxydierten wir zunächst eine wässrige Suspension des Kohlenwasserstoffes bei Siedehitze mit Kaliumpermanganat. Aus der Reaktionsflüssigkeit gewannen wir in ungefähr gleicher Menge zwei Säuren, in denen wir die Benzol-1, 2, 4-trikarbonsäure (Trimellithsäure) und die Benzol-1, 2, 3, 4-tetrakarbonsäure (Mellophansäure) erkannten. Zur Trennung destillierten wir das Gemisch der Methylester im Hochvakuum; die bei 100—140° (Luftbadtemperatur) übergehende Fraktion bestand größtenteils aus dem öligen Trimellithsäuremethylester. Er wurde mit Salpetersäure (Dichte 1.3) auf dem Wasserbad verseift und die freie Säure mit Ammoniak in die Imidkarbonsäure verwandelt; der Schmelzpunkt dieser Verbindung lag bei 266—267° und wurde durch Vermischen mit einer Probe von Trimellithsäureimidkarbonsäure, die aus Chelidonin⁵ dargestellt wurde, nicht erniedrigt. Die bei 140—180° übergehende Esterfraktion lieferte beim Umkristallisieren reinen Mellophansäuretetramethylester vom F. P. 131—132°; die Mischung mit einem aus Bulbokapnin⁶ gewonnenen Präparat der gleichen Konstitution zeigte keine Schmelzpunktsdepression.

Dieses Ergebnis der Oxydation gestattet, da unter den Versuchsbedingungen an eine Entstehung der Trimellithsäure aus Mellophansäure nicht zu denken ist, die Zahl der für Trimethylnaphthalin möglichen Formeln (14) für das Sapotalin auf drei zu beschränken:

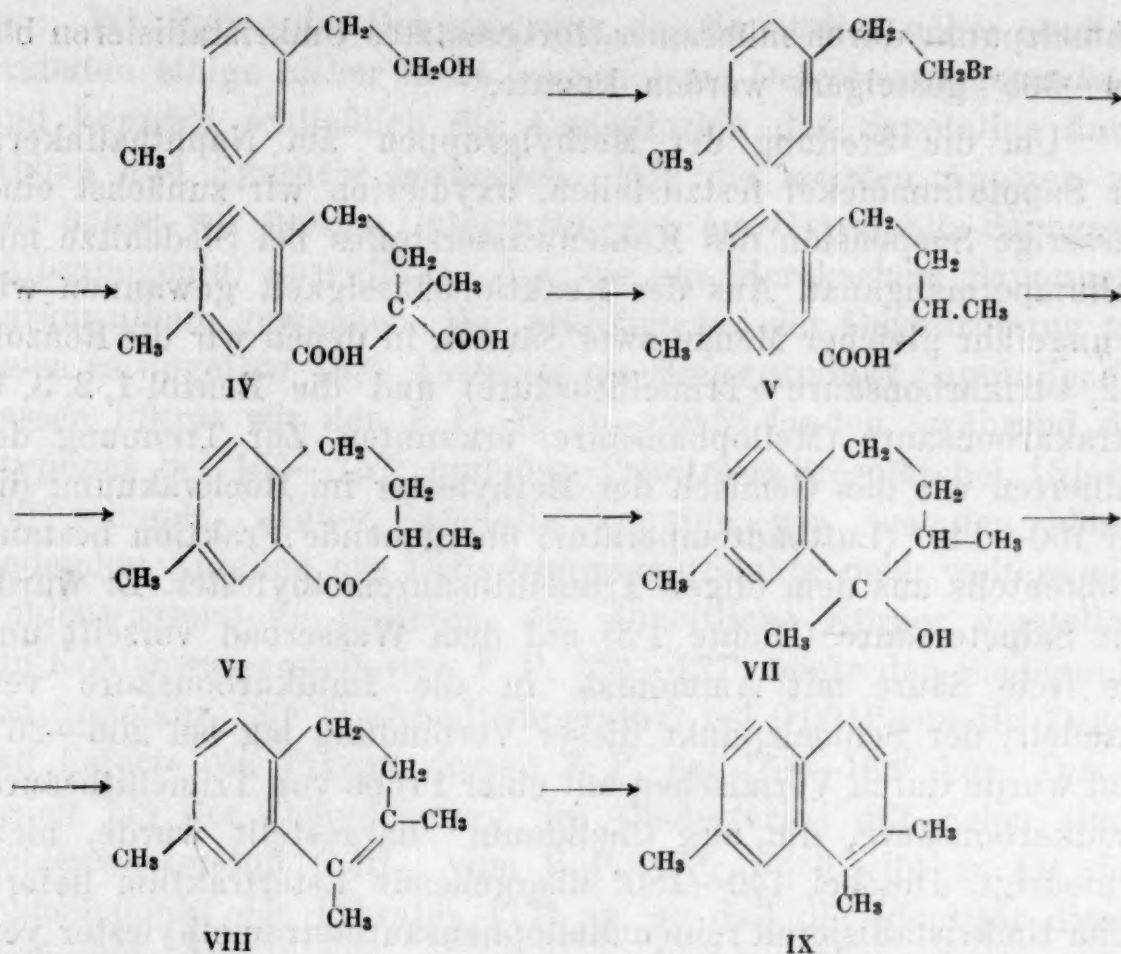


Die Verbindung I ist bekannt; sie wurde von v. BAEYER und VILLIGER⁷ aus Jonon dargestellt, und diese Autoren geben den F. P. des Pikrates mit 122—123° an. Wir haben die Verbindung II synthetisiert; die Synthese führte über folgende Zwischenstufen:

⁵ E. SPÄTH, F. KUFFNER, Ber. D. ch. G. 64, 1931, S. 370.

⁶ E. SPÄTH, H. HOLTER, R. POSEGA, Ber. D. ch. G. 61, 1928, S. 322.

⁷ A. v. BAEYER, V. VILLIGER, Ber. D. ch. G. 32, 1899, S. 2429.



β -*p*-Tolyläthylalkohol erhielten wir nach einer Vorschrift von V. GRIGNARD⁸ in über 80% Ausbeute. Für das daraus durch Erhitzen mit Bromwasserstoff entstehende Bromid fanden wir in Übereinstimmung mit v. BRAUN⁹ den Siedepunkt 115° bei 16 mm Hg. Durch Kondensation dieses Bromides mit Methylmalonester unter dem Einfluß von Natriumäthylat gewannen wir den Diäthylester der Säure IV, der durch Verseifen in die Dikarbonsäure IV und durch Abspaltung von CO₂ in die Monokarbonsäure V übergeführt wurde. Aus dem mittels Thionylchlorids erhältlichen Chlorid stellten wir zur Charakterisierung der Säure das Amid dar, das den F. P. 146—149° zeigte. Das Säurechlorid lieferte beim innermolekularen Ringschluß mit Aluminiumchlorid das Keton VI, das durch sein Semikarbazon charakterisiert wurde. Bei der Einwirkung von Methylmagnesiumjodid auf das Keton VI entsteht ein Alkohol VII, den wir jedoch nicht isolierten, sondern durch Wasserabspaltung mit Essigsäureanhydrid sogleich in den Kohlenwasserstoff VIII überführten. Die Dehydrierung dieses 1,2,7-Trimethyl-3,4-dihydronaphthalins erreichten wir sowohl katalytisch mit Palladium-Tierkohle bei 200° als auch durch Ein-

⁸ V. GRIGNARD, Ann. chim. phys. [8] 10, 1907, S. 23.

⁹ J. v. BRAUN, K. WIRZ, Ber. D. ch. G. 60, 1927, S. 102.

wirkung von Selen bei 300°. Das so entstandene 1, 2, 7-Trimethylnaphthalin IX war ein stark riechendes, farbloses Öl und wurde durch die Darstellung des Pikrates, Styphnates und Trinitro-m-kresolates charakterisiert. Die Schmelz- und Mischschmelzpunkte dieser drei Derivate erwiesen, daß das Sapotalin mit dem 1, 2, 7-Trimethylnaphthalin identisch ist.

Dieser Kohlenwasserstoff wird wahrscheinlich einen wesentlichen Bestandteil der Molekel des Albsapogenins vorstellen.

Experimenteller Teil.

Dehydrierung des Sapogenins.

10 g Sapogenin wurden mit 10 g rotem Selen verrieben und im Stickstoffstrom während 30 Stunden auf 300—340° erhitzt. Der Kolben war durch Schliff mit einem Rückflußkühler und zwei mit Kohlensäure-Azeton gekühlten Vorlagen verbunden. In den Vorlagen sammelte sich dabei Wasser an und ein sehr übelriechendes Öl (Vorlauf A, 2.5 g).

Der Kolbeninhalt wurde mit Äther behandelt. Die Hauptmenge des Reaktionsproduktes löste sich mit gelbgrüner Fluoreszenz (Lösung B). Als Rückstand blieb ein schwarzer Selenkuchen und eine braune kristallisierte Substanz C.

Der Abdampfrückstand der Ätherlösung B wurde fraktioniert destilliert. Die im folgenden angegebenen Temperaturen sind Luftbadtemperaturen und geben nicht die Siedepunkte der Substanzen an.

Fraktion I: bei 12 mm Hg bis 120°, wurde mit dem Vorlauf A vereinigt.

Fraktion II: bei 12 mm Druck und 120—180°.

Fraktion III: bei 0.001 mm Druck und 100—200°.

Fraktion IV: bei 0.015 mm Druck und 200—290°.

Weiteres Fraktionieren der Fraktion II gab nach einem Vorlauf bis 120°, der ebenfalls mit A vereinigt wurde, eine Fraktion II b bei 120—160°, 1.83 g eines hellgelben Öles, das mit einer heißgesättigten alkoholischen Lösung von 2.46 g Pikrinsäure versetzt wurde und dadurch 2.18 g Pikrat lieferte. Nach mehrmaligem Umkristallisieren lag der F. P. bei 127.5—128.5°. Das so erhaltene Sapotalinpikrat bildete orangerote Nadeln.

Analyse:

3.896 mg Substanz gaben 8.175 mg CO₂ und 1.640 mg H₂O.

C₁₃H₁₄·C₆H₃O₇N₃. Ber. C 57.12, H 4.29%.

Gef. C 57.23, H 4.71%.

Ein Teil des Pikrates wurde in 1%ige Natronlauge gebracht und der in Freiheit gesetzte Kohlenwasserstoff mit Wasserdampf überdestilliert. Das Destillat wurde mit Äther ausgeschüttelt und das Sapotalin nochmals über Natrium destilliert. Durch Zusatz einer heißgesättigten Lösung von Styphninsäure bzw. von Trinitro-*m*-kresol wurden die betreffenden Derivate des Sapotalins dargestellt. Styphnat: gelbe Nadeln, F. P. 155—157°; Trinitro-*m*-kresolat: gelbe Nadeln, schwer löslich in Alkohol, F. P. 151—153°.

Analyse des Styphnates:

3·956 mg Substanz gaben 7·895 mg CO₂ und 1·495 mg H₂O.

C₁₃H₁₄·C₆H₃O₈N₃. Ber. C 54·92, H 4·13%.

Gef. C 54·43, H 4·23%.

Fraktion II c, Nachlauf, wurde mit III vereinigt; die Destillation von III ergab eine Fraktion III a, 100—150° bei 0·0012 mm Hg, wobei die Hauptmenge bei 120° überging. 0·75 g eines beweglichen Öles, das mit einer alkoholischen Lösung von 1 g Pikrinsäure versetzt wurde. Die beim Erkalten abgeschiedenen Kristalle wurden durch Abpressen mit Filtrierpapier von verunreinigenden harzigen Massen größtenteils befreit und wogen nach dem Umkristallisieren aus absolutem Alkohol 0·2 g. Orangegelbe Nadeln, F. P. 161—163° nach schwachem Sintern bei 158°. Der aus dem Pikrat mit Lauge in Freiheit gesetzte Kohlenwasserstoff wurde im Hochvakuum bei 120—140° destilliert. Er schmolz im Vakuumröhrchen bei 126—127°.

Analyse des Kohlenwasserstoffes:

3·373 mg Substanz gaben 11·510 mg CO₂ und 2·260 mg H₂O.

Gef. C 93·07, H 7·50%.

Analyse des Pikrates:

3·371 mg Substanz gaben 7·535 mg CO₂ und 1·290 mg H₂O.

Gef. C 60·96, H 4·28%.

Fraktion III b: 150—185° bei 0·0012 mm Druck, Hauptmenge geht bei 170° über. Zähes Öl, Ausbeute 0·57 g, wurde mit einer alkoholischen Lösung von 0·72 g Pikrinsäure versetzt. Es entstanden 0·28 g eines in Alkohol schwer löslichen Pikrates, dessen Fp. durch Umlösen aus Azeton und Ausfällen mit Alkohol auf 213—215° stieg. Der aus dem Pikrat mit Lauge in Freiheit gesetzte Kohlenwasserstoff wurde durch Hochvakuumdestillation und Umlösen aus Äther-Methylalkohol in farblosen Kristallen erhalten, die im Vakuumröhrchen bei 116° schmolzen.

Analyse des Kohlenwasserstoffes:

4.193 mg Substanz gaben 14.125 mg CO₂ und 2.990 mg H₂O.

Gef. C 91.87, H 7.98%.

Analyse des Pikrates:

3.391 mg Substanz gaben 7.175 mg CO₂ und 1.385 mg H₂O.

Gef. C 57.71, H 4.57%.

Fraktion IV war ein zähes braunes Öl, dessen höher siedende Anteile zu gelben Kristallen erstarrten. Sie wurde mit den Kristallen C vereinigt und im Soxhletapparat mit Äther erschöpfend extrahiert. Beim Einengen auf zirka 5 cm³ kristallisierten im Kühlschrank Kristalle D aus. Die ätherischen Mutterlaugen von D wurden nach dem Abdampfen des Äthers destilliert. Beim Fraktionieren im Hochvakuum wurden zwei Fraktionen bei 190—210° und bei 210—225° aufgefangen, die beide (0.69 bzw. 0.86 g) ein Pikrat vom Fp. 213—215° lieferten, das mit dem oben beschriebenen identisch war.

Die Kristalle D wurden nach dem Umkristallisieren aus Tetralin im Hochvakuum sublimiert. Nach einem kleinen öligen Vorlauf gingen während vier Stunden, wobei die Luftbadtemperatur auf 210° eingestellt war und erst zum Schluß auf 250° gesteigert wurde, hellgelbe Kristalle über; diese waren noch nicht einheitlich. Die zuerst übergangenen Anteile zeigten einen Fp. von zirka 230°, die Mittelfraktion schmolz bei zirka 250°, die höchstsiedende Fraktion bei zirka 280°. Die Trennung der Substanzen war sehr schwierig, was durch die geringen Löslichkeits- und Siedepunktsunterschiede und durch die verhältnismäßig geringe Substanzmenge verursacht war. Sie wurde durch mehrmalige fraktionierte Destillation und durch Umlösen aus viel Alkohol bewirkt, in dem die höher schmelzende Substanz fast ganz unlöslich ist. Die alkoholischen Mutterlaugen wurden durch Sublimieren und Umkristallisieren der leichter flüchtigen Anteile aus Eisessig gereinigt. Der Fp. der so gewonnenen Kristalle lag im evakuierten Röhrchen bei 228—230.5°. Eine vielleicht mögliche weitere Reinigung konnte wegen der geringen Substanzmenge nicht mehr durchgeführt werden. Der Mischschmelzpunkt mit einem nach den Angaben von DIELS und Mitarbeitern aus Cholesterin erhaltenen Kohlenwasserstoff, dessen Schmelzpunkt nach dem Umkristallisieren aus Eisessig bei 227—228° lag, zeigte starke Depression (200—225°).

Analyse:

3.651 mg Substanz gaben 12.580 mg CO₂ und 2.115 mg H₂O.

Gef. C 93.97, H 6.48%.

Die bei höherer Temperatur, 220—230° unter 0·001 mm Druck, sublimierende Verbindung wurde abwechselnd aus Tetralin, Thiophen, Benzol und Propylalkohol umkristallisiert, zentrifugiert und sublimiert. Der Fp. stieg schließlich auf 304—305°.

Analyse:

3·477 mg Substanz gaben 11·925 mg CO₂ und 1·930 mg H₂O.

Gef. C 93·54, H 6·21 %.

Oxydation des Sapotalins.

1·003 g Sapotalinpicrat wurden in 40 cm³ 1%iger Natronlauge gebracht und am absteigenden Kühler destilliert. Unter weiterem Zusatz von insgesamt etwa 100 cm³ Wasser wurde die Destillation fortgesetzt, bis keine Öltröpfchen des Kohlenwasserstoffes mehr übergingen. Die wässrige Emulsion wurde unter Rückflußkühlung am siedenden Wasserbad erhitzt und während 360 Stunden portionenweise Kaliumpermanganat eingetragen. Nach Verbrauch von 3·8 g (ber. etwa 4·5 g) Kaliumpermanganat wurde wegen des sehr langsam gewordenen Verlaufes der Reaktion die Oxydation unterbrochen, mit 25 cm³ konz. Salzsäure angesäuert, durch Zusatz von SO₂ der Braunstein in Lösung gebracht und die Flüssigkeit, in der sich ein Öl abgeschieden hatte, im Extraktor erschöpfend mit Äther ausgezogen. Der Extrakt wurde mit Natronlauge aufgenommen und mehrmals mit Äther ausgeschüttelt, um nichtsaure Verbindungen zu entfernen. Die alkalische Lösung wurde nun wieder angesäuert und neuerlich mit Äther extrahiert. So wurden 0·238 g saure Oxydationsprodukte gewonnen und daraus unter Zusatz von absolutem Methylalkohol mittels Diazomethans die Methylester dargestellt. Bei der Destillation im Hochvakuum ging die erste Fraktion bei 100—140° über, die zweite bei 140—180°. Beide wurden mit einigen Kubikzentimetern Äther übergossen, wobei Fraktion II größtenteils kristallisierte, während sich aus Fraktion I nur wenig Kristalle abschieden. Die Ätherlösungen wurden abgegossen, die Kristalle mit wenig eisgekühltem Äther gewaschen und aus Methylalkohol umkristallisiert. Der Schmelzpunkt lag bei 131—132°, der Mischschmelzpunkt mit einem aus Bulbokapnin gewonnenen Mellophansäuretetramethylester (Fp. 132—133°) lag bei 131—133°. Mithin ist als Oxydationsprodukt des Sapotalins Mellophansäure nachgewiesen. Die ätherische Mutterlauge des Mellophansäureesters wurde nochmals im Hochvakuum destilliert. Das bis 130° über-

gangene Öl wurde mit 4 cm^3 Salpetersäure (Dichte 1.3) auf dem Wasserbade erhitzt. Das Öl ging rasch in Lösung. Die Salpetersäure wurde nun verdampft und der Rückstand mehrmals mit Salpetersäure, zuletzt mit konzentrierter, abgedampft. Nach Umkristallisieren aus Salpetersäure wurde auf einer Glassinternutsche abgesaugt. Der Schmelzpunkt lag unter Aufschäumen bei 222° , was für das Vorliegen von Trimellithsäure sprach. Ein Teil der Säure wurde mit 12%igem Ammoniak zweimal abgedampft und der Rückstand im Vakuum der Wasserstrahlpumpe destilliert. Der bei einer Luftbadtemperatur von $290\text{--}310^\circ$ übergangene Teil wurde bei $300\text{--}310^\circ$ redestilliert und schmolz im evakuierten Röhrchen bei $266\text{--}267^\circ$, nach schwachem Sintern bei 264° . Eine aus Chelidonin gewonnene Trimellithsäure gab nach der gleichen Behandlung eine bei der gleichen Temperatur schmelzende Imidkarbonsäure. Beide Stoffe wurden dann zusammen sublimiert; das Mischsublimat schmolz nach schwachem Sintern im Vakuumröhrchen bei $266\text{--}267^\circ$, zeigte also keine Depression.

Synthese des Sapotalins.

β -*p*-Tolyläthylalkohol (aus *p*-Bromtoluol und Äthylenchlorhydrin) wurde in einem Bombenrohr unter Eiskühlung mit Bromwasserstoff gesättigt, wobei der Röhreninhalt zu einer festen Kristallmasse, möglicherweise einer Additionsverbindung, erstarrte. Nach dem Zerschmelzen wurde 5 Stunden auf 110° erhitzt, der Bombenininhalt mit Benzol aufgenommen und mit Wasser durchgeschüttelt. Der zwischen 110 und 120° bei 16 mm Druck übergehende Anteil wurde erneut mit Bromwasserstoff behandelt. Das Bromid siedet bei 115° bei 16 mm.

In einem Bombenrohr wurden 1.48 g Natrium in 25 cm^3 absolutem Alkohol gelöst. Nach dem Erkalten wurde mit 10.2 g Methylmalonester gut vermischt und 11.6 g β -*p*-Tolyläthylbromid zugesetzt. Die Mischung wurde im Schüttelbombenofen 5 Stunden auf 130° erhitzt, Wasser zugesetzt und mit Äther mehrmals ausgeschüttelt. Der Äther wurde getrocknet, abgedampft und der Ester bei $191\text{--}192^\circ$ und 14 mm Druck destilliert. Farbloses viskoses Öl, Ausbeute 6 g.

Zu einer Lösung von 5 g KOH in 4 cm^3 H_2O wurden 6 g des β -*p*-Tolyläthylmethylmalonesters zugefügt und unter Rückflußkühlung 30 Minuten zum Sieden erhitzt. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde die alkalische Lösung zweimal mit Äther ausge-

schüttelt, dann angesäuert und mit Äther extrahiert. Nach dem Abdampfen des Äthers kristallisierte die Malonsäure und zeigte nach zweimaligem Umkristallisieren aus Benzol den Fp. 160—161°.

Analyse:

3·593 mg Substanz gaben 8·725 mg CO₂ und 2·170 mg H₂O.

C₁₃H₁₆O₄. Ber. C 66·07, H 6·84%.

Gef. C 66·23, H 6·76%.

7 g β -*p*-Tolyläthylmethylmalonsäure wurden in einem Sublimationsröhrchen 30 Minuten auf 180° erhitzt; die CO₂-Entwicklung hatte schon nach 15 Minuten aufgehört. Die entstandene Monokarbonsäure wurde im Wasserstrahlvakuum bei 190—200° Luftbadtemperatur destilliert und ging als farbloses, viskoses Öl über, das in 10 cm³ Petroläther gelöst und mit 15 cm³ Thionylchlorid 2 Stunden auf 75° erhitzt wurde. Dann wurden Petroläther und Thionylchlorid abdestilliert und neuerdings mit 10 cm³ Thionylchlorid 1 Stunde auf 50° erwärmt. Das Säurechlorid destillierte bei 150—160° Luftbadtemperatur im Wasserstrahlvakuum über; farbloses Öl, Ausbeute 4·4 g.

Eine kleine Menge des Säurechlorides wurde in Petroläther gelöst und mit trockenem Ammoniak behandelt. Der Petroläther wurde abdestilliert und das Säureamid aus Benzol umkristallisiert. Vakuumschmelzpunkt 146—147° (völlig klar bei 149°).

Analyse der Säureamides:

3·135 mg Substanz gaben 8·600 mg CO₂ und 2·575 mg H₂O.

C₁₂H₁₇ON. Ber. C 75·33, H 8·97%.

Gef. C 74·81, H 9·19%.

4·3 g des Säurechlorides wurden in 15 cm³ Petroläther vom Siedepunkt 75—100° gelöst und zu einer Suspension von 4 g Aluminiumchlorid in 10 cm³ Petroläther gegossen; nach dem Abklingen der ersten Einwirkung wurde unter Rückflußkühlung 2 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten wurde Eis zugesetzt, 20 cm³ Salzsäure (1 : 1) zugefügt und im Scheidetrichter getrennt. Die saure Lösung wurde viermal ausgeäthert, die Ätherlösungen mit Natriumsulfat getrocknet und der Äther abgedampft. Das 2,7-Dimethyltetralon-1 siedet bei 142—143° unter 16 mm Druck. Farbloses Öl, Ausbeute 3·4 g.

0·1 g des Tetralons wurde in 4 cm³ Alkohol gelöst und mit einer Lösung von 0·09 g Semikarbazid-hydrochlorid und 0·09 g Natriumazetat in 2 cm³ Wasser versetzt. Dann wurde 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbade erhitzt. Nach teilweisem Ein-

dem dunsten der Lösung kristallisierte das Semikarbazon beim Erkalten aus und schmolz nach Umlösen aus Methylalkohol-Wasser bei 204—206° im Vakuumröhrchen.

Analyse:

2·820 *mg* Substanz gaben 6·950 *mg* CO₂ und 1·815 *mg* H₂O.

C₁₃H₁₇ON₃. Ber. C 67·48, H 7·41 %.

Gef. C 67·21, H 7·20 %.

1·8 *g* Magnesium wurden mit 10·7 *g* Jodmethyl in 30 *cm*³ Äther grignardiert und nach gutem Kühlen 3·3 *g* des obigen Ketons in 20 *cm*³ Äther zugefügt. Dann wurde 3 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt und über Nacht stehen gelassen. Nach vorsichtigem Zersetzen mit Eis wurden 10 *cm*³ konz. Salzsäure und 30 *cm*³ Wasser zugesetzt und mit Äther extrahiert. Die Ätherlösung wurde mit Natriumsulfat getrocknet, der Äther im Vakuum vertrieben und mit 25 *cm*³ Essigsäureanhydrid gekocht. Nach einer Stunde wurde das überschüssige Essigsäureanhydrid durch Kochen mit Wasser zerstört, mit festem Natriumhydroxyd neutralisiert und stark alkalisch viermal mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über Ätzkali wurde abgedampft und das Trimethyl-dihydronaphthalin über Natrium destilliert. Bei einer Luftbadtemperatur von 140—160° ging es unter 16 *mm* als stark riechendes, farbloses Öl über. Ausbeute 2·92 *g*.

Dehydrierung des Trimethyl-dihydronaphthalins.

a) Katalytisch. 0·3 *g* Dihydrokörper wurden mit 0·3 *g* Palladium-Tierkohle 3 Stunden im Metallbad auf 190—200° erhitzt. Dann wurde das Reaktionsprodukt mit Äther aufgenommen, filtriert, abgedampft und über Natrium destilliert. Bei einer Luftbadtemperatur von 160° gingen 0·27 *g* eines farblosen Öles im Wasserstrahlvakuum über. Diese wurden mit einer heißgesättigten Lösung von 0·37 *g* Pikrinsäure in Alkohol versetzt. Nach dem Erkalten kristallisierte das Pikrat in langen, orangefarbenen Nadeln aus. Der Fp. stieg beim Umkristallisieren aus Alkohol auf 131—131·5°.

Analyse:

4·091 *mg* Substanz gaben 8·600 *mg* CO₂ und 1·660 *mg* H₂O.

C₁₃H₁₄·C₆H₃O₇N₃. Ber. C 57·12, H 4·29 %.

Gef. C 57·33, H 4·54 %.

b) Mit Selen. 1.1 g Dihydrokörper wurden mit 0.6 g Selen 30 Stunden auf 300° erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde in gleicher Weise aufgearbeitet wie bei der katalytischen Dehydrierung. Ausbeute an Kohlenwasserstoff 1.028 g. Das Pikrat dieses Präparates schmolz im Vakuumröhrchen bei 130.5—131.5°. Das Styphnat zeigte nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Alkohol den Fp. 159.5—160°; der Mischschmelzpunkt mit Sapotalinstyphnat lag im evakuierten Röhrchen bei 158—159°. Das in alkoholischer Lösung gewonnene Trinitro-*m*-kresolat schmolz bei 154 bis 155°. Mischschmelzpunkt mit Sapotalin-Trinitro-*m*-kresolat bei 152—153.5°.

Analyse des Styphnates:

4.058 mg Substanz gaben 8.175 mg CO₂ und 1.615 mg H₂O.

C₁₃H₁₄.C₆H₃O₈N₃. Ber. C 54.92, H 4.13%.

Gef. C 54.94, H 4.45%.

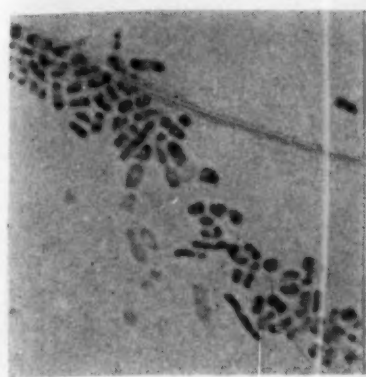
Analyse des Trinitro-*m*-kresolates:

3.411 mg Substanz gaben 7.230 mg CO₂ und 1.470 mg H₂O.

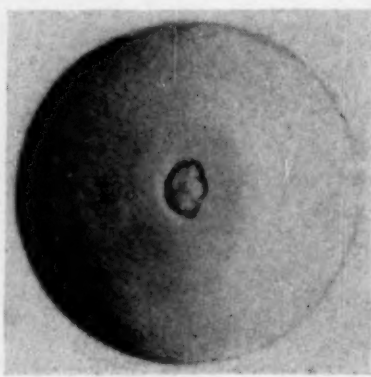
C₁₃H₁₄.C₇H₃O₇N₃. Ber. C 58.09, H 4.63%.

Gef. C 57.81, H 4.82%.

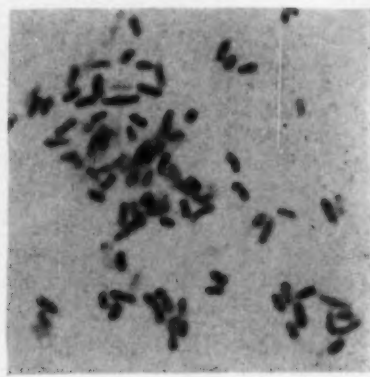
FRANZ FUHRMANN, Studien zur Biochemie der Leuchtbakterien I



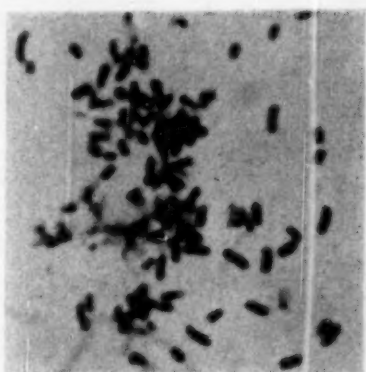
1



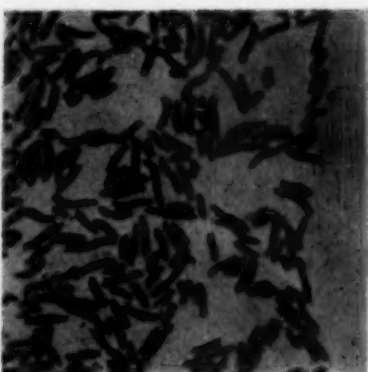
2



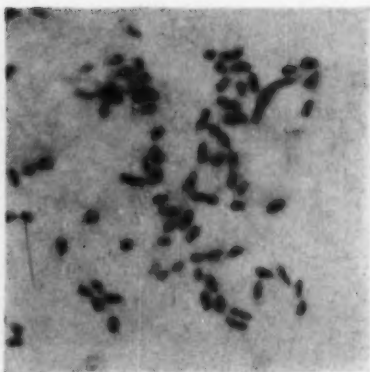
3



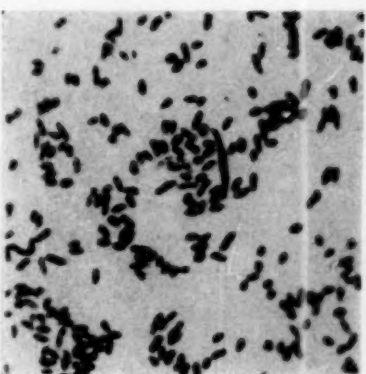
4



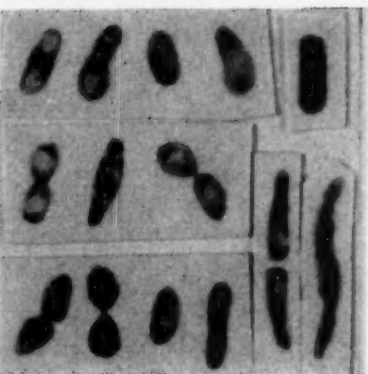
5



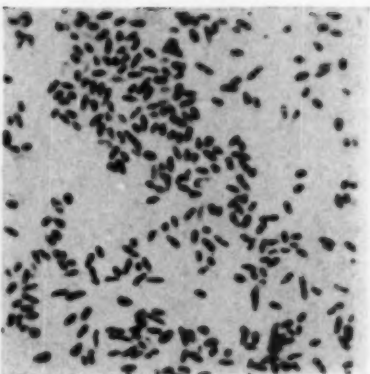
6



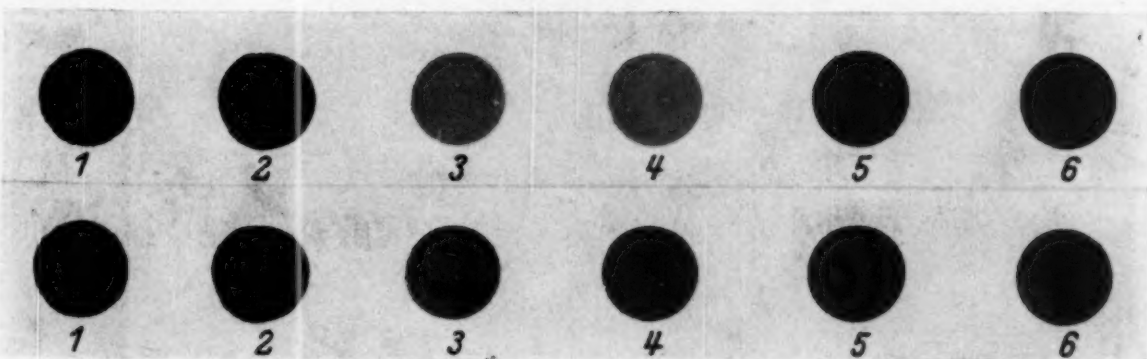
7



9



8



10